



**HAL**  
open science

# Implication des récepteurs P2X de l'ATP et du calcium dans la polarisation microgliale

Patrick Wolf

► **To cite this version:**

Patrick Wolf. Implication des récepteurs P2X de l'ATP et du calcium dans la polarisation microgliale. Neurosciences. Université de Strasbourg, 2023. Français. NNT : 2023STRAJ037 . tel-04266953

**HAL Id: tel-04266953**

**<https://theses.hal.science/tel-04266953>**

Submitted on 1 Nov 2023

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ**  
**LCAMB (UMR7199) et INCI (UPR 3212)**

**THÈSE** présentée par :

**Patrick WOLF**

soutenue le : **31 mai 2023**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : **Neurosciences**

**Implication des récepteurs P2X de l'ATP et  
du calcium dans la polarisation microgliale**

**THÈSE dirigée par :**

**Mr Grutter Thomas**

Directeur de recherche, université de Strasbourg

**Mr Schlichter Rémy**

Professeur, université de Strasbourg

**RAPPORTEURS :**

**Mme ULMANN Lauriane**

Maitre de conférences, université de Montpellier

**Mr MENTAVERRI Romuald**

Professeur, université Picardie Jules Vernes

**AUTRES MEMBRES DU JURY :**

**Mme BEFORT Katia**  
Strasbourg

Chargée de recherche CNRS, université de

**Mr BOUE-GRABOT**

Directeur de recherche, université de Bordeaux

## Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier le Docteur Boué-Grabot pour m'avoir fait l'honneur de présider ce jury de thèse.

Je remercie très sincèrement la Docteure Ulmann et le Professeur Mentaverri d'avoir accepté d'être mes rapporteurs de thèse.

Merci également à la Docteure Befort et au Docteur Boué-Grabot d'avoir accepté de faire partie de ce jury de thèse en tant qu'examineurs.

Un grand merci au Docteur Grutter et au Professeur Schlichter pour leurs accueils chaleureux dans leurs équipes. C'est toujours un grand plaisir d'échanger avec vous deux, en duo ou en trio ! Merci à toi Thomas de m'avoir encadré durant cette thèse, conseillé et encouragé. Rémy, merci d'avoir codirigé cette thèse et pour le temps que tu y as consacré.

Merci à EURIDOL, graduated school of pain, d'avoir financé cette thèse et de m'avoir accompagné durant sa réalisation.

Merci à mes deux laboratoires d'accueil, le CAMB et l'INCI, tous deux situés à Strasbourg. J'ai eu plaisir à apprendre à vos côtés, que ce soit les techniques de biologies molécules en début de thèse, avec Adeline et Federico au CAMB ou l'imagerie à l'INCI, notamment grâce à Sylvain et Rémy.

Alexander, merci beaucoup pour nos échanges, ton soutien, les petits projets en commun. Merci d'être là depuis le tout début, avant même la thèse, j'espère que nous arriverons toujours à échanger sur nos projets ! Tu es un super frère et je suis sûr que tu seras un excellent chercheur ! Ammra, merci d'être là, de m'avoir aidée durant ces quatre années (Et surtout ! Merci de prendre soin d'Alex).

Merci, aux copains de labo, diurne et nocturne, l'ambiance a toujours été au rendez-vous. Malgré toutes les complications que nous avons pu rencontrer pendant nos thèses ou stages, c'était toujours un plaisir de venir au labo.

Merci également à l'équipe d'enseignement Biologie Animal, avec qui j'ai pris grand plaisir à enseigner durant ces trois années.

Merci aux personnes qui ont partagé un petit bout de chemin à l'université de Strasbourg avec moi et que j'ai perdu de vue ces dernières années, mais qui ont, grandement, contribué à mon épanouissement universitaire.

Soso, ces dernières années n'étaient pas toujours évidentes, mais je sais que je te dois beaucoup, donc un grand merci pour ta présence et ton soutien du master à la (fin) de la thèse.

Mama, Papa (et deuxième papa et deuxième mama), merci pour votre soutien durant mes trèèèèes longues études. J'ai toujours pu compter sur vous, peu importe le moment et la raison. J'espère pouvoir passer un peu plus de temps avec vous avant de m'envoler vers d'autres contrées.

## Table des matières

I.	Abréviations.....	1
II.	Liste des figures et des tableaux .....	4
II.1	Figures .....	4
II.2	Tableaux .....	7
III.	Introduction.....	8
III.1	La neuroinflammation .....	9
III.1.1	Les médiateurs de la neuroinflammation .....	13
III.1.2	Les médiateurs cellulaires .....	13
III.1.2.1	Les cellules gliales.....	13
III.1.2.1.1	La microglie .....	13
III.1.2.1.2	Origine des cellules microgliales .....	13
III.1.2.1.3	Morphologie des cellules microgliales .....	15
III.1.2.1.4	Activation des cellules microgliales.....	19
III.1.2.1.5	Fonctions microgliales.....	24
III.1.2.1.6	Microglies et fonctions physiologiques.....	25
III.1.2.1.7	Surveillance microgliale en condition physiologique .....	27
III.1.2.1.8	La surveillance microgliale est calcium dépendante.....	28
III.1.2.1.9	Chef d’orchestre de la réponse neuroinflammatoire .....	30
III.1.2.1.10	Les sécrétions microgliales activent les astrocytes .....	31
III.1.2.1.11	Les astrocytes .....	31
III.1.2.1.12	Morphologies des astrocytes .....	33
III.1.2.1.13	Les astrocytes en condition physiologique .....	33
III.1.2.1.14	Les astrocytes dans la neuroinflammation .....	36
III.1.2.1.15	Lorsque la microglie est déficiente, les astrocytes prennent le relais.....	36
III.1.2.2	Les neurones.....	37
III.1.2.3	Les oligodendrocytes.....	39
III.1.2.4	Les cellules périvasculaires.....	39
III.1.2.5	Les macrophages périphériques.....	39
III.1.3	Médiateurs moléculaires de la neuroinflammation.....	39
III.1.3.1	Marqueurs d’activation microgliale .....	40
III.1.3.2	Présentation d’antigènes.....	40
III.1.3.3	Protéines membranaires et transmembranaires .....	40

III.1.3.4	Protéine intracellulaires et effectrices .....	44
III.1.3.5	Molécules solubles .....	45
III.1.3.6	Phénotype pro inflammatoire (M1) .....	46
III.1.3.7	Phénotype anti inflammatoire (M2).....	47
III.2	Système purinergique .....	49
III.2.1	Les récepteurs de l'adénosine .....	50
III.2.2	Les récepteurs métabotropes P2Y .....	51
III.2.3	Les récepteurs-canaux P2X.....	52
III.2.3.1	Structure des récepteurs P2X.....	52
III.2.3.2	Sites de liaison des agonistes .....	55
III.2.3.3	Sites de liaison des antagonistes .....	55
III.2.3.4	Sites allostériques.....	55
III.2.3.5	Activation, désactivation et désensibilisation des récepteurs P2X .....	56
III.2.4	Les différentes sous-unités des récepteurs P2Xs .....	57
III.2.4.1	Le récepteur P2X1 .....	58
III.2.4.2	Le récepteur P2X2 .....	59
III.2.4.3	Le récepteur P2X3 .....	60
III.2.4.4	Le récepteur P2X4 .....	61
III.2.4.5	Le récepteur P2X5 .....	62
III.2.4.6	Le récepteur P2X6 .....	62
III.2.4.7	Le récepteur P2X7 .....	63
III.2.5	Pharmacologie des récepteurs P2Xs .....	65
III.2.5.1	Agonistes des récepteurs P2Xs.....	65
III.2.5.2	Antagonistes des récepteur P2Xs.....	68
III.2.5.3	Antagonistes sélectifs de P2X1.....	69
III.2.5.4	Antagonistes sélectifs de P2X2.....	70
III.2.5.5	Antagonistes sélectifs de P2X3.....	71
III.2.5.6	Antagonistes sélectifs de P2X4.....	72
III.2.5.7	Antagonistes sélectifs de P2X7.....	73
III.2.5.8	Conclusion concernant la pharmacologie P2X .....	73
III.2.6	Neuroinflammation et signalisation purinergique .....	74
III.3	Récepteur sensible au calcium (CaSR).....	79
III.3.1	Structure .....	81

III.3.2	Pharmacologie du CaSR.....	87
III.3.2.1	Modulateurs orthostériques.....	87
III.3.2.2	Modulateurs allostériques.....	87
III.3.3	Voies de transductions intracellulaires.....	90
III.3.3.1	Introduction sur les protéines G.....	90
III.3.3.2	Les protéines G <sub>q/11</sub> .....	91
III.3.3.3	Les protéines G <sub>i/o</sub> .....	92
III.3.3.4	Les protéines G <sub>12/13</sub> .....	92
III.3.3.5	La protéine G <sub>s</sub> .....	92
III.3.3.6	Les Rho GTPases et les β-arrestines.....	93
III.3.3.7	Protéines kinases.....	94
III.3.3.7.1	Akt et GSK-3.....	95
III.3.3.7.2	Les MAP kinases.....	95
III.3.4	Biais systémique et biais par le ligand.....	96
III.3.5	CaSR et fonctions immunitaires.....	98
IV.	Objectifs du travail de thèse.....	106
V.	Matériels et Méthodes.....	108
V.1	Substances pharmacologiques.....	108
V.2	Culture des cellules BV-2.....	109
V.3	Imagerie du calcium libre intracellulaire.....	112
V.3.1	Chargement des cellules BV-2 avec la sonde ratiométrique Fura-2.....	112
V.3.2	Mesures des variation du calcium libre intracellulaire ([Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> ).....	112
V.3.3	Analyse des changements de [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> .....	113
V.3.4	Application des substances.....	113
V.3.5	Incubation des cellules avec des substances.....	114
V.3.6	Courbes doses réponses.....	114
V.3.7	Analyses statistiques.....	115
V.4	Changements morphologiques.....	115
V.4.1	Ajout des substances.....	115
V.4.2	Evaluation des changements morphologiques.....	116
V.4.3	Analyses statistiques.....	117
V.5	Immunocytochimie.....	118
V.5.1	Acquisition - microscopie confocale.....	120

V.5.2	Réglages utilisés pour l'acquisition d'images .....	120
V.5.3	Analyse des intensités de fluorescence.....	120
V.5.4	Analyse statistique .....	120
V.6	Biologie moléculaire .....	121
VI.	Résultat.....	122
VI.1	Caractérisation de récepteurs-canaux P2X de l'ATP exprimés par les cellules BV-2 .....	122
VI.1.1	Contexte : ATP et cellules microgliales.....	122
VI.1.2	Stratégie expérimentale .....	123
VI.1.3	Effet de divers agonistes sur la $[Ca^{2+}]_i$ des cellules BV-2 .....	127
VI.1.4	Désensibilisation des réponses aux agonistes.....	129
VI.1.5	Effets des antagonistes des récepteurs P2X1 et P2X3 .....	130
VI.1.6	Effets des antagonistes des récepteurs P2X4 et P2X7 .....	134
VI.1.7	Présence de récepteurs P2X5 et P2X1/5 fonctionnels sur les cellules BV-2. ....	137
VI.1.8	Présence et propriétés des réponses au GTP dans les cellules BV-2 .....	137
VI.1.9	Effet du TNP-ATP sur la $[Ca^{2+}]_i$ .....	140
VI.1.10	Interactions fonctionnelles entre les récepteurs P2Xs présents dans les cellules BV-2 ...	141
VI.1.11	5-BDBD et TNP-ATP .....	142
VI.1.12	Suramine et 5-BDBD .....	142
VI.1.13	BBG et A740003.....	143
VI.1.14	Effets de prétraitement des cultures avec du LPS ou de l'IL-4 sur l'expression fonctionnelle des récepteurs P2X.....	144
VI.1.15	Réponses propres au TNP-ATP. ....	145
VI.2	Identification du récepteur sensible au calcium dans la lignée microgliale BV-2 .....	147
VI.2.1	Présence fonctionnelle du CaSR dans la lignée microgliale BV-2 : .....	150
VI.2.1.1	Présence du CaSR dans la lignée BV-2, intensité totale. ....	150
VI.2.1.2	Fonctionnalité du CaSR dans la lignée microgliale BV-2 : .....	151
VI.2.2	Modulation du CaSR et changements morphologiques des cellules BV-2.....	153
VI.2.3	Effet de deux anti-inflammatoires sur le changement morphologique induit par le LPS ou le R 568 .....	159
VI.2.4	Effet du NPS 2143 sur le changement morphologie des cellules BV-2 induit par le LPS ou le R568 .....	160
VI.3	Changement morphologique et voies intracellulaires .....	161
VI.4	CaSR et prolifération cellulaire .....	163
VI.5	CaSR et polarisation des cellules microgliales BV-2 .....	165

VI.5.1	CaSR et polarisation pro inflammatoire – marquage CD68 .....	167
VI.5.2	CaSR et polarisation anti inflammatoire –marquage CD206.....	168
VI.5.3	CaSR et actine corticale .....	171
VI.5.4	Activation du CaSR et sécrétion de cytokines .....	173
VI.5.4.1	Cytokines pro-inflammatoires.....	175
VI.5.4.2	Molécules chémoattractantes.....	176
VI.5.4.3	Facteurs de croissance .....	177
VI.5.4.4	Molécules d'adhésion.....	177
VI.5.4.5	Molécule anti-inflammatoire IL-1ra .....	177
VI.5.4.6	Molécules impliquées dans le développement, la survie et l'homéostasie.....	178
VI.5.4.7	Interféron $\gamma$ (INF- $\gamma$ ) .....	178
VII.	Discussion .....	180
VII.1	Cellules microgliales et récepteurs P2X.....	180
VII.1.1	Récepteurs P2X à haute affinité pour l'ATP : P2X1, P2X3 et P2X1/5. ....	181
VII.1.2	Récepteurs P2X à affinités intermédiaires et faibles pour l'ATP.....	185
VII.1.3	Interactions fonctionnelles des récepteurs P2X.....	186
VII.1.4	Effets de prétraitements au LPS ou à l'IL-4 .....	189
VII.1.5	Schéma de synthèse et conclusion sur les interactions entre récepteurs P2Xs dans les cellules BV-2 .....	190
VII.1.6	Signification physiologique des interactions entre récepteurs P2Xs dans la détection de l'ATP extracellulaire.....	191
VII.2	Discussion CaSR .....	193
VII.2.1	Les changements morphologiques pourraient être dépendants du CaSR et non de TLR-4 .....	197
VII.2.2	L'activation du CaSR microglial pourrait activer l'adénylate cyclase 7 (par l'intermédiaire de la protéine $G_{12/13}$ ).....	198
VII.2.3	Le CaSR exprimé par les cellules BV-2 pourrait être couplé à $G_s$ .....	199
VII.3	Interactions potentielles entre la signalisation purinergique et le CaSR .....	201
VIII.	Conclusions et perspectives .....	207
IX.	Bibliographies .....	209
X.	Annexe.....	234



# I. Abréviations

**2-MeSATP** : 2-Méthylthio-adenosine 5'-triphosphate

## A

**ABC**: transporteurs à cassette liant l'ATP (*ATP binding cassette*)

**$\alpha\beta$ MetATP**:  $\alpha,\beta$ -Méthylène adenosine 5'-triphosphate

**ADIS**: agonist-driven insertional signaling

**Akt (PKB)**: protéine kinase B

**AM**: acétoxy méthyle

**AMP** : adénosine 3' 5' monophosphate

**AMPc** : adénosine 3' 5' monophosphate cyclique

**Arg1**: Arginase 1

**ARN**: Acides Ribonucléiques

**ARNm**: Acides RiboNucléiques messagers

**ATP**: adénosine triphosphate

**ATP $\gamma$ S**: adenosine 5'-[ $\gamma$ -thio] triphosphate

**Axl**: recepteur tyrosine kinase Axl

## B

**BBG** : Brilliant blue G

**BDNF** : facteur neurotrophique dérivé du cerveau (*brain-derived neurotrophic factor*)

**$\beta,\gamma$ MetATP**:  $\beta,\gamma$ -méthylenadenosine 5'-triphosphate

**BHE** : barrière hémato-encéphalique

**BSA**: albumine de sérum bovin

**BzATP**: 2'(3')-O-(4-Benzoylbenzoyl) adenosine 5'-triphosphate

## C

**CAM** : Calmoduline

**CAMKII** : Calmoduline kinase II

**CAPS**: syndrome périodique associé à la cryopyrine

**CaSR**: Récepteur sensible au calcium extracellulaire

**CCL** : Chemokine (C-C motif) ligand

**CD11b** : Intégrine alpha M

**CD** : classe de différenciation

**Cdc42**: Cell division control protein 42

**CMH** : complexe majeur d'histocompatibilité

**CryoEM**: Cryo-electron microscopy

**CSF**: Colony-stimulating factor

**CSFR1**: Colony-stimulating factor receptor 1

**CXCL** : chimiokine de type CXC

## D

**DAG**: diacylglycérol

**DAMP** : Motif moléculaire associé aux dégâts

**DMEM** : Dulbecco's Modified Eagle Medium

**DRG** : ganglions de la racine dorsale

## E

**EAE**: Encéphalomyélite allergique expérimentale

**EC<sub>50</sub>** : Concentration efficace médiane

**EGF:** facteur de croissance épidermique

**ERK:** extracellular signal regulated kinase

## F

**FIZZ1:** found in inflammatory zone

## G

**GABA:** acide  $\gamma$ -aminobutyrique

**Gas6:** Growth Arrest-Specific Gene 6

**GDP:** guanosine diphosphate

**GFAP :** protéine acide fibrillaire gliale

**GNR:** glial neurone ratio

**GSK:** glycogen synthase kinase

**GTP:** guanosine triphosphate

## H

**HEPES:** acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique

## I

**IBA-1:** ionized calcium-binding adapter molecule 1

**ICAM-5 :** InterCellular Adhesion Molecule (CD54)

**IC<sub>50</sub> :** concentration inhibitrice médiane

**IgG :** immunoglobulines de type G

**IL :** interleukine

**Il-1ra :** interleukin-1 receptor antagonist protein

**INF :** interféron

**iNOS:** NOS inductible

**IP<sub>1</sub>:** inositol monophosphate

**IP<sub>2</sub>:** inositol bisphosphate

**IP<sub>3</sub>:** inositol trisphosphate

**IP<sub>3</sub>R:** récepteur à l'inositol trisphosphate

**IVM:** ivermectine

## J

**JNK:** Jun N-terminal Kinase

## K

**KCC2:** co-transporteur potassium-chlorure de type 2

## L

**LPS:** lipopolysaccharide

## M

**MAC-1:** macrophage antigen 1

**MAPK:** mitogen-activated protein kinases

**MMP :** métalloprotéases matricielles

## N

**NCAM :** Neural cell adhesion molecule

**NFKB:** nuclear factor-kappa B

**NLR:** nucleotide oligomerization domain receptors

**NLRP3:** NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3

**NO:** monoxide d'azote

## P

**PA:** potentiel d'action

**PAMP:** motifs moléculaires associés aux pathogènes

**PBS:** phosphate Buffer Saline

**pERK**: phosphorylated extracellular signal regulated kinase

**PFA**: Paraformaldéhyde

**Pi**: Phosphate inorganique

**PIP<sub>2</sub>**: phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate

**PK (A, B, C)**: protéine kinase A, B, C

**PLC**: phospholipases C

**PPADS**: pyridoxalphosphate-6-azophenyl-2', 4'-disulfonic acid

## R

**RB-2**: reactif bleu 2

**RC**: region riche en cystéines

**RCPG** : récepteur couplé au protéine G

**ROI** : region d'intérêt

## S

**Sema-7A** : Sémaphorine 7A (CD108)

**SH3**: homologie de Src 3 (*Src homology 3*)

**SNC** : système nerveux central

**STAM-1 (AMSH-1)**: *Signal Transducing Adaptor Molecule 1*

**SUR** : SUR

**SVF** : sérum de veau foetal

## T

**TAM** : Tyro3-Axl-Mer

**TGF-β** : facteur de croissance transformant β

**TLR**: Toll-Like Receptor

**TM**: segment transmembranaire

**TNF α**: Tumor Necrosis Factor α

**Trp**: tryptophane

## U

**u.a** : Unité Arbitraire

## V

**VFT** : Venus fly trap

## II. Liste des figures et des tableaux

### II.1 Figures

Figure 1 : Activation microgliale et altération du système nerveux central. ....	10
Figure 2 : Origine des cellules microgliales. ....	14
Figure 3 : L'activation microgliale s'accompagne de changements morphologiques.....	15
Figure 4 : Proportion de cellules microgliales primaires ramifiées en fonction des conditions de culture...	16
Figure 5 : Caractéristiques anatomiques de cellules microgliales provenant de quatre régions distinctes du système nerveux central. ....	17
Figure 6 : Reconstruction en 3D de la morphologie de cellules microgliales provenant de différentes espèces animales .....	18
Figure 7 : Priming Microgliale.....	20
Figure 8 : Fonctions microgliales en conditions physiologiques et pathologiques. ....	22
Figure 9 : Aspects neuroprotecteurs et neurotoxiques de la neuroinflammation. ....	24
Figure 10 : Fonction microgliale. ....	26
Figure 11 : Calcium et cellules microgliales.....	29
Figure 12 : Facteurs sécrétés par les cellules microgliales.....	30
Figure 13 : Fonction astrocytaire en condition physiologique (sain) et inflammatoire (réactif). ....	35
Figure 14 : Lorsque la microglie est déficiente les astrocytes prennent le relai.....	37
Figure 15 : Les neurones maintiennent les cellules microgliales dans un état quiescent .....	38
Figure 16 : Différentes protéines exprimées à la membrane plasmique microgliale, ainsi que leurs ligands, pouvant être impliqués dans l'activation cellulaire. ....	41
Figure 17 : Protéines membranaires et solubles en fonction de l'état d'activation de la microglie.. ....	43
Figure 18 : Les différents récepteurs des purines. ....	50
Figure 19 : Homologie des différents sous unités P2X.....	53
Figure 20 : Structures de différents récepteurs P2Xs, provenant de différentes espèces.....	54
Figure 21 : Désensibilisation en fonction des différents récepteurs P2Xs de rat.....	57
Figure 22 : Effets d'une augmentation du calcium extracellulaire sur la concentration de calcium intracellulaire.....	79
Figure 23 : Exprimé dans l'ensemble de l'organisme, le CaSR va remplir diverses fonctions tissu-spécifiques et va être impliqué dans diverses pathologies.....	80
Figure 24 : Structure du CaSR (cryo-EM). ....	81
Figure 25 : Mécanisme d'ouverture du CaSR. ....	84
Figure 26 : Voies intracellulaires du CaSR.. ....	86
Figure 27 : Protéines G hétérotrimériques.....	91
Figure 28 : Signalisation des RhoGTPases.. ....	94
Figure 29 : Exemple de molécules avec agonisme biaisé.....	98
Figure 30 : Nombre de gènes surexprimés par les cellules BV-2 et par la microglie primaire murine, après stimulation au LPS (50 µg/ml).. ....	109
Figure 31 : Schéma général de l'organisation des expériences.. ....	110
Figure 32 : Exemple de cellules BV-2 en culture (48h, DMEM, 10% SVF, 1% P/S).....	116

Figure 33 : pEC <sub>50</sub> pour chacun des types de récepteurs en fonction des différents agonistes (ATP, αβmetATP, BzATP et ADP).....	125
Figure 34 : pIC <sub>50</sub> pour chacun des types de récepteurs en fonction des différents antagonistes (Suramin et TNP-ATP).....	125
Figure 35 : Effet de divers agonistes sur la [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> des cellules BV-2. ....	128
Figure 36 : Désensibilisation des réponses aux agonistes.....	130
Figure 37 : Effets du TNP-ATP sur la réponse des récepteurs P2X1 et P2X3. ....	132
Figure 38 : Effets du NF449 et du TC-P 262 sur la réponse des récepteurs P2X1 et P2X3.....	133
Figure 39 : Récepteur P2X4, effet de l'αβmeATP (100 μM) seul et en présence de 5-BDBD (10μM)(A) et d'ivermectine (5μM) (B) .....	135
Figure 40 : Effet de l'application répétée de BzATP (100μM) sur les [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> des cellules BV-2 en présence de A740003 (1μM)(A) et de AZ10606120 (1μM)(B).....	136
Figure 41 : Propriétés des réponses au GTP par les cellules microgliales BV-2. ....	138
Figure 42 : Effet du TNP-ATP sur les [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> . ....	141
Figure 44 : Courbe concentration réponse de l'effet propre du TNP-ATP. ....	146
Figure 45 : Image de microscopie confocale de cellules BV-2. ....	149
Figure 46 : Histogramme représentant l'intensité de fluorescence pour le marquage du CaSR.....	150
Figure 47 : Histogramme représentant la proportion de cellules BV-2 répondant (augmentation du [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> ) à divers agonistes (± antagoniste).....	151
Figure 48 : Histogramme du % de CaSR exprimé dans la région subplasmalemmale de cellules BV-2 « contrôles » ou traitées au LPS.....	152
Figure 49 : Image de microscopie de cellules BV-2, Avant traitement et après 24h de traitement.....	153
Figure 50 : Histogramme représentant le ratio de cellules BV-2 allongées sur total .....	154
Figure 51 : Image de microscopie de cellules BV-2, Avant traitement et après 24h de traitement.....	155
Figure 52 : Histogramme représentant le ratio de cellules BV-2 allongées sur total, .....	156
Figure 53 : Image de microscopie de cellules BV-2 .....	157
Figure 54 : Histogramme représentant le ratio de cellules BV-2 allongées sur total. ....	158
Figure 55 : Effet de deux anti-inflammatoires (IL4 et resatorvid) sur la proportion de cellules BV-2 allongées.....	159
Figure 56 : Effet du NPS-2143 sur la proportion de cellules BV-2 allongées.....	160
Figure 57 : Effet du SB203580 (inhibiteur de p38) sur la proportion de cellules BV-2 allongées. ....	161
Figure 58 : Effet de la PTX (inhibiteur G <sub>i/o</sub> ), du PD98059 (inhibiteur MAP kinases) et de l'YM254890 (inhibiteur G <sub>q/11</sub> ) sur les changements morphologiques induits par l'augmentation du Ca <sup>2+</sup> (1,8 mM à 10 mM ). ....	162
Figure 59 : Prolifération des cellules BV-2.....	164
Figure 60 : Histogramme de l'effet du NPS2143 sur le % de prolifération (J4/J1) en fonction des différents traitements.....	164
Figure 61 : Image de microscopie confocale de cellules BV-2. ....	166
Figure 62 : Histogramme représentant l'intensité de fluorescence pour le marquage CD68 .....	167
Figure 63 : Image de microscopie confocale de cellules BV-2. ....	169
Figure 64 : Représentation graphique de l'intensité de fluorescence pour le marquage CD206.....	170

Figure 65 : Graphique représentant l'intensité de fluorescence pour le marquage de l'actine corticale (u.a) de cellules BV-2. ....	172
Figure 66 : Image des membranes de cytokines array (4 min exposition).....	174
Figure 67 : Schéma de synthèse et de conclusion, basé sur nos données expérimentales, sur les interactions entre récepteurs P2Xs dans les cellules microgliales murines BV-2. ....	190
Figure 68 : Schéma hypothétique des interactions indirectes entre la signalisation TLR-4 et le CaSR.....	198
Figure 69 : Cycle du CaSR et ADIS (Agonist-Driven Insertional Signalling). ....	202
Figure 70 : Variation du calcium intracellulaire libre, avec ou sans Pi dans le milieu extracellulaire. ....	204
Figure 71 : Schéma hypothétique des interactions indirectes entre la signalisation P2X, TLR-4 et le CaSR. ....	206
Figure 72 : Structure et particularité du récepteur P2X7. ....	235

## II.2 Tableaux

Tableau 1 : Perméabilités au $\text{Ca}^{2+}$ en fonction des différents récepteurs P2X.....	57
Tableau 2 : Principaux agonistes des récepteurs P2X et leur $\text{EC}_{50}$ moyen.....	66
Tableau 3 : Modulateurs allostériques positifs des récepteurs P2Xs.....	67
Tableau 4 : Antagonistes non sélectifs des récepteurs P2X et leurs $\text{IC}_{50}$ .....	68
Tableau 5 : Antagonistes sélectifs du récepteur P2X1 et leurs $\text{IC}_{50}$ .....	69
Tableau 6 : Antagonistes sélectifs du récepteur P2X2 et leurs $\text{IC}_{50}$ .....	70
Tableau 7 : Antagonistes sélectifs du récepteur P2X3 et leurs $\text{IC}_{50}$ .....	71
Tableau 8 : Antagonistes sélectifs du récepteur P2X4 et leurs $\text{IC}_{50}$ .....	72
Tableau 9 : Antagonistes sélectifs du récepteur P2X7 et leurs $\text{IC}_{50}$ .....	73
Tableau 10 : Différents agonistes orthostériques et modulateurs allostériques du CaSR.....	89
Tableau 11 : Fonctions du CaSR dans le système nerveux central, en fonction du type cellulaire. ....	102
Tableau 12 : Substances pharmacologiques utilisées pour caractériser le profil purinergique P2X .....	108
Tableau 13 : Substances pharmacologiques utilisées pour la caractérisation du CaSR.....	109
Tableau 14 : Concentrations et produits pour le milieu extracellulaire HEPES .....	112
Tableau 15 : Tableau résumé des $\text{EC}_{50}$ et $\text{IC}_{50}$ en $\mu\text{M}$ pour les récepteurs P2Xs de souris.. ....	124
Tableau 16 : Tableau récapitulatif des cytokines pro-inflammatoires dosées.....	175
Tableau 17 : Tableau récapitulatif des molécules chemoattractantes dosées.....	176
Tableau 18 : Tableau récapitulatif des facteurs de croissance, molécule d'adhésion et anti inflammatoire dosées.....	177
Tableau 19 : Tableau récapitulatif des molécules impliquées dans le développement, la survie cellulaire, l'homéostasie et l'activation de macrophage dosées.....	178
Tableau 20 : Effet du TNP-ATP (antagoniste P2X1, P2X3, P2X1/5) en présence de 5-BDBD (antagoniste P2X4) .....	186
Tableau 21 : Effet du 5-BDBD (antagoniste P2X4) en présence de suramine (antagoniste P2X3, P2X5 et P2X1/5).....	187
Tableau 22 : Effet du A740003 (antagoniste P2X7) en présence de 5-BDBD –antagoniste P2X4) et de TNP-ATP (antagoniste P2X1, P2X3 et P2X1/5) .....	188
Tableau 23 : Effet du BBG (antagoniste P2X7 et P2X5) en présence de 5-BDBD (antagoniste P2X4) et de TNP-ATP (antagoniste P2X1, P2X3 et P2X1/5) .....	189
Tableau 24 : Mutations réalisées sur le récepteur P2X7 de rat. ....	236

### III. Introduction

L'inflammation est un processus biologique clé permettant de répondre aux traumatismes subis par les tissus et les cellules. Elle met en jeu le système immunitaire, qui va pouvoir faire la différence entre le « soi » et le «non-soi» et réagir en conséquence en produisant et sécrétant des cytokines, chimiokines, seconds messagers et espèces réactives de l'oxygène. Une réponse inflammatoire efficace élimine les agents pathogènes et déclenche la régénération des tissus (Netea et al., 2017).

Le système nerveux central, composé de l'encéphale et de la moelle épinière, est isolé du reste de l'organisme par la barrière hématoencéphalique (BHE). Isolé et protégé par cette barrière, longtemps considérée comme imperméable en condition physiologique, le système nerveux central était vu comme immunologiquement inerte. Effectivement, lors de l'étude du système nerveux central, plusieurs équipes indépendantes ont montré qu'une greffe de tissus périphériques dans le système nerveux central est rejeté plus lentement qu'ailleurs dans l'organisme (Medawar, 1948) (Carson et al., 2006). Ces observations ont permis de décrire des niches immunologiquement privilégiées. D'autres observations vont également dans ce sens. Par exemple, l'induction de l'encéphalomyélite auto-immune, décrite comme une inflammation du système nerveux central, avec des répercussions cognitives et motrices dans un modèle murin nécessite la transplantation de lymphocytes T actifs dans le système nerveux central, suggérant une composante périphérique, partielle ou totale, dans l'inflammation du système nerveux central (Swanborg, 2001). De même, dans les pathologies démyélinisantes, des lymphocytes T activés sont retrouvés dans les régions démyélinisées, suggérant encore une fois l'implication d'une composante immunitaire périphérique régulant l'inflammation du système nerveux central (Carson et al., 2006).

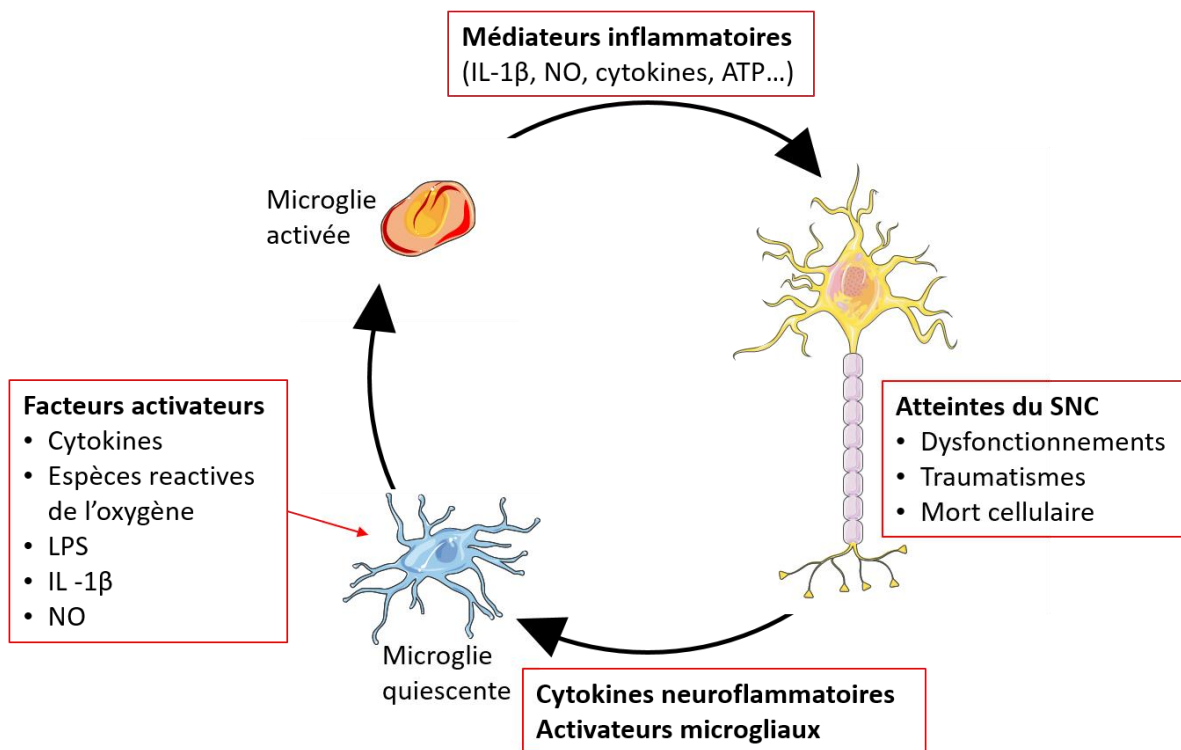
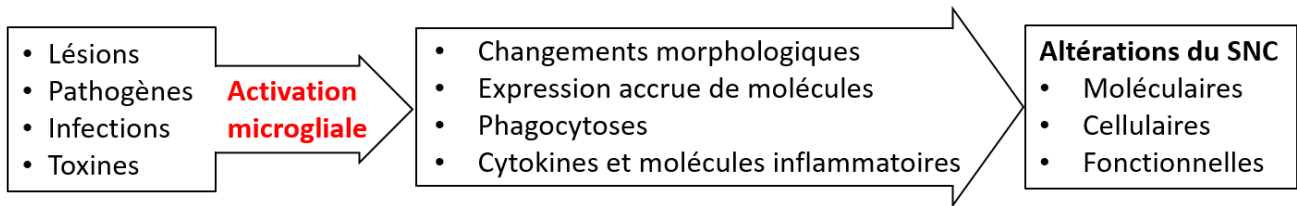


Dans cette vision historique, le système nerveux central est protégé exclusivement par l'imperméabilité de la BHE. Il ne peut pas se défendre contre une agression, ne possède pas de cellules immunocompétentes, et nécessite la présence du système immunitaire périphérique pour se protéger (Carson et al., 2006).

De nos jours, le statut immunitaire du système nerveux central a été revu (Gale, Bechmann et Perry, 2007). En effet, lors d'une inflammation, il y a bien une composante périphérique mise en jeu, mais la réponse primaire fait intervenir des cellules résidentes du système nerveux central (Carson et al., 2006).

### III.1 La neuroinflammation

La neuroinflammation est une réaction inflammatoire dans l'encéphale et/ou la moelle épinière. C'est un phénomène complexe au cours duquel le système nerveux central coopère avec le système immunitaire pour assurer protection et homéostasie (Figure 1). Cette inflammation du système nerveux central est médiée, comme pour l'inflammation périphérique, par des changements morphologiques et phénotypiques des cellules de l'immunité innée cérébrale. Dans le système nerveux central, les médiateurs de l'inflammation sont produits par les cellules gliales résidentes du système nerveux central : microglies et astrocytes (Kwon et Kho, 2020). Nos travaux sont consacrés à l'étude de la microglie. Ces cellules dérivent de la lignée monocyttaire et présentent des fonctions similaires à celles des macrophages périphériques. Elles sont considérées comme les cellules immunocompétentes du système nerveux central et sont les premières à répondre en cas d'agressions du système nerveux central (Figure 1) (Shabab et al., 2017).



*Figure 1 : Activation microgliale et altération du système nerveux central. Lésions, infections ou autres affections vont activer la microglie. Cette activation va engendrer des modifications phénotypiques et morphologiques engendrant des altérations du système nerveux central (dysfonctionnements, dommages et morts cellulaires). Ces altérations vont à leurs tours promouvoir l'activation microgliale. Adaptée de Shabab et al., 2017*

Ainsi une lésion ou une infection du SNC va :

1. Entraîner un changement graduel de la morphologie de la microglie. Elle va passer d'une morphologie ramifiée, synonyme de quiescence, à ronde, synonyme d'activation ([Fernández-Arjona et al., 2019](#)).
2. Une activation microgliale, qui suit un schéma bien défini :
  - a. Prolifération.
  - b. Augmentation de l'expression de molécules immunes.
  - c. Recrutement et migration vers le site lésé ou infecté.
  - d. Changements fonctionnels (libération de facteurs cytotoxiques, inflammatoires...).
3. Si l'inflammation persiste, elle peut devenir néfaste pour l'organisme et perd son signal d'alarme.

D'autres types cellulaires, comme les neurones, les cellules périvasculaires et les macrophages infiltrants vont également participer activement à la neuroinflammation. Cette neuroinflammation va avoir des conséquences immunitaires, physiologiques, psychologiques et biochimiques. De plus, son degré dépend du contexte, de la durée et de l'intensité du stimulus primaire ou de la lésion. Par exemple, elle peut engendrer le recrutement des cellules immunitaires périphériques, la formation d'un œdème, des lésions tissulaires, voire même la mort cellulaire ([Shabab et al., 2017](#)).

Cette neuroinflammation est commune à un grand nombre de situations : infections du système nerveux central (encéphalite, poliomyélite...), troubles neurologiques précoces (trouble du spectre de l'autisme (TSA), trouble déficit de l'attention avec ou sans hyperactivité (TDAH), maladies neurodégénératives (Alzheimer, Parkinson) ([Kwon et Kho, 2020](#)), douleur neuropathique ([Ellis et Bennet, 2013](#)), troubles génétiques (maladie de Huntington) ou encore maladies auto-immunes (sclérose latérale amyotrophique et sclérose en plaques) ([Shabab et al., 2017](#)). Bien que l'ensemble de ces pathologies altère le fonctionnement du système nerveux central, leur mode de progression va différer. En effet, deux modes de progression

neuroinflammatoire, un modèle linéaire et un modèle plastique ont été décrits (Perry, Cunningham et Holmes, 2007).

1. Progression linéaire : la microglie quiescente est activée par un stimulus. Plus l'exposition est intense et longue, plus les cellules sont activées. Ce modèle linéaire revient à stimuler des cellules microgliales en culture avec du lipopolysaccharide (LPS) à forte concentration. La stimulation va provoquer la synthèse et la sécrétion de nombreuses cytokines différentes sans tenir compte de la nature précise de l'affection.
2. Progression plastique : la microglie répond à la nature précise du stimulus, au temps d'exposition et à l'intensité du stimulus. Cette activation, dictée par la nature du stimulus, permet à la microglie de répondre de façon adéquate, précise et moduler sa réponse en fonction des différentes pathologies. Dans ce modèle, chaque pathologie va entraîner une production précise de cytokines, différentes en fonctions du stimulus.

Jusqu'au début des années 2000, cette activation microgliale était considérée comme néfaste et destructrice pour le système nerveux central. Depuis, il a été montré qu'elle suit un schéma d'activation plus nuancé et complexe. En effet, en 2002 (Combrinck, Perry et Cunningham, 2002) et en 2005 (Cunningham et al., 2005), deux équipes indépendantes ont montré que l'activation microgliale est dépendante non seulement de la nature du stimulus, mais également de la fréquence d'exposition à divers stimuli immuns. En effet dans un modèle murin de maladie à prions, Combrick et al. (2002), ont montré qu'une infection périphérique exacerbe l'inflammation du système nerveux central (Combrinck, Perry et Cunningham, 2002). De même, Cunningham et al. (2005), obtiennent des résultats similaires, cette fois dans un modèle murin de neurodégénérescence chronique. Après avoir exposé des animaux malades à des injections centrales ou périphériques d'endotoxine (LPS), ils observent une augmentation de l'inflammation dans le système nerveux central ainsi qu'une mort neuronale accrue (Cunningham et al., 2005).

Cette initiation du changement phénotypique microglial est désignée par le terme «*priming*». Le *priming* suggère que la microglie, après avoir été exposée à un premier stimulus va avoir une réponse exagérée au stimulus suivant, qu'ils soient de même nature ou non (Haley et al., 2019).

### III.1.1 Les médiateurs de la neuroinflammation

La microglie et les astrocytes sont les principaux types cellulaires impliqués dans l'initiation et le maintien de la neuroinflammation. En condition neuroinflammatoire, leurs interactions, ainsi que les interactions avec les autres types cellulaires, neurones, oligodendrocytes, cellules périvasculaires et macrophages périphériques infiltrants changent et vont *in fine* induire des altérations fonctionnelles du système nerveux central (Kwon et Kho, 2020).

### III.1.2 Les médiateurs cellulaires

#### III.1.2.1 Les cellules gliales

La première observation de la glie s'est probablement faite en même temps que la découverte des neurones en 1837 par Jan Purkinje. Beaucoup moins grosses que les neurones, dépourvues d'activité électrique régénérative de type potentiel d'action (PA), ces cellules ont été décrites comme de la glue (« *Nervenkitt* ») par Rudolf Virchow en 1846. Il en existe deux familles, classé historiquement en fonction de leur taille : la microglie et la macroglie. Concernant les proportions de cellules gliales par rapport aux neurones (GNR, pour glial neurone ratio), historiquement, un ratio de 10:1 pour le cerveau humain fut proposé (von Bartheld et al., 2016). Longtemps considéré comme exacte, et repris dans les grands ouvrages de neurosciences, il s'avère que le GNR dépend des espèces et la structure nerveuse étudiée. En effet pour l'encéphale humain, le ratio est proche de un, mais dans la moelle épinière le ratio est proche de sept cellules gliales pour un neurone (Bahney et von Bartheld, 2018). De même, en fonction de l'espèce, le ratio GNR va varier, par exemple dans le cortex cérébral des rongeurs, le ratio est proche de 0,3 alors que pour l'éléphant ou la baleine ce ratio est compris entre 4 et 8 (Verkhatsky, Zorec et Parpura, 2019).

##### III.1.2.1.1 La microglie

La microglie est constituée de cellules gliales de petite taille, disséminées dans le système nerveux central. Elles sont en charge du maintien de l'homéostasie du système nerveux central.

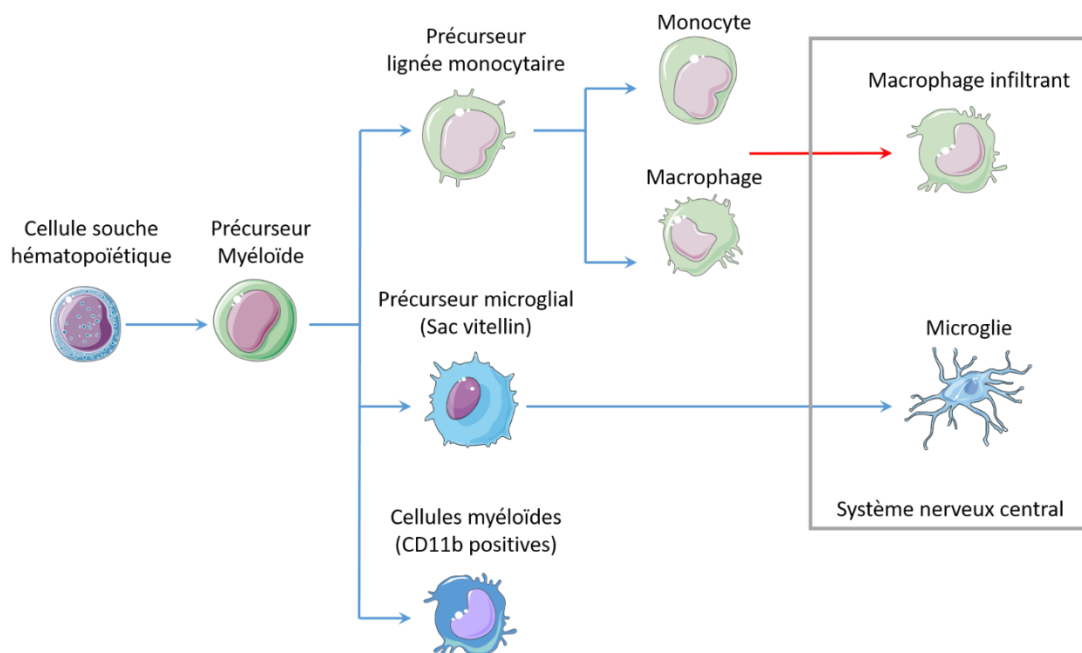
##### III.1.2.1.2 Origine des cellules microgliales

L'origine mésodermique de la microglie a d'abord été suggérée par del Rio-Hortega, en 1919 et 1921. Néanmoins, cette origine atypique pour ces cellules résidentes dans le système nerveux central (SNC) a été débattue pendant de longues années. Il faudra attendre 1979, pour qu'une équipe mette fin à ce débat. Cette étude s'intéresse à la colonisation du système nerveux central

par la microglie. Les cellules mésodermiques ont été marquées et le cerveau a été collecté après avoir attendu entre six heures et cent jours (Boya, Calvo et Prado, 1979).

Dans leur article « *The origin of microglial cells* » Boya, Calvo et Prado (1979) démontrent l'origine myéloïde (Figure 2) de la microglie mais également qu'elle colonise le système nerveux central à la fin du développement embryonnaire et durant les premiers jours de vie néonatale, lors de la fermeture de la barrière hématoencéphalique (Boya, Calvo et Prado, 1979) (Ginhoux et Prinz, 2015).

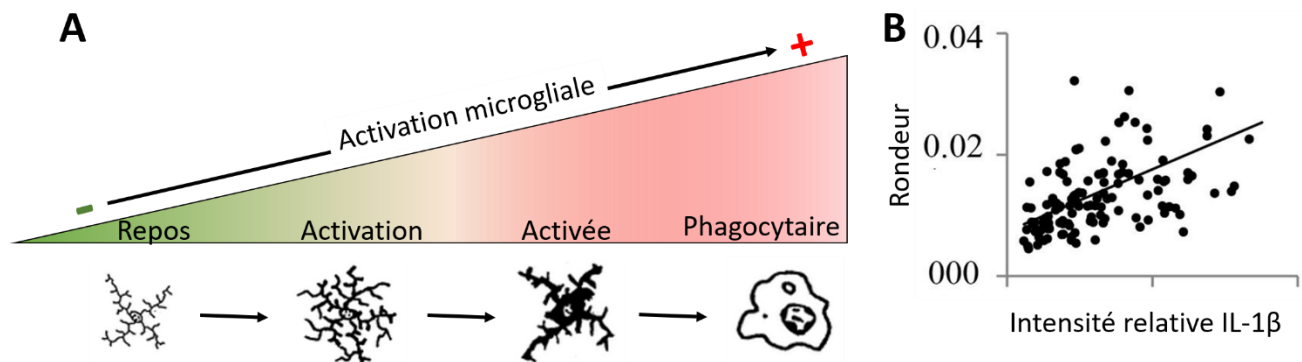
A l'âge adulte, ces cellules, considérées comme des macrophages résidents, représentent environ 20% de l'ensemble des cellules du système nerveux central.



*Figure 2 : Origine des cellules microgliales. La microglie dérive des cellules souches hématopoïétiques, qui vont donner le précurseur myéloïde, puis les précurseurs de la lignée monocyttaire et celui des cellules microgliales. Les cellules microgliales colonisent le système nerveux central à la fin du développement embryonnaire et sont les macrophages résidents du système nerveux central. Les monocytes et les macrophages périphériques vont infiltrer le SNC en cas de dérégulation ou de pathologie.*

### III.1.2.1.3 Morphologie des cellules microgliales

La réponse de la microglie à un stimulus engendre des changements morphologiques (Figure 3) et phénotypiques en fonction du moment de la vie et suivant leurs états d'activation. Une cellule microgliale au repos a un petit soma et de nombreux prolongements. Une activation modérée, augmente la taille du corps cellulaire et les prolongements se font plus rares. Finalement, si la stimulation devient trop longue ou intense, la microglie devient « hyper-réactive », perd sa fonction de protection, devient phagocytaire et adopte une morphologie ronde (Figure 3).

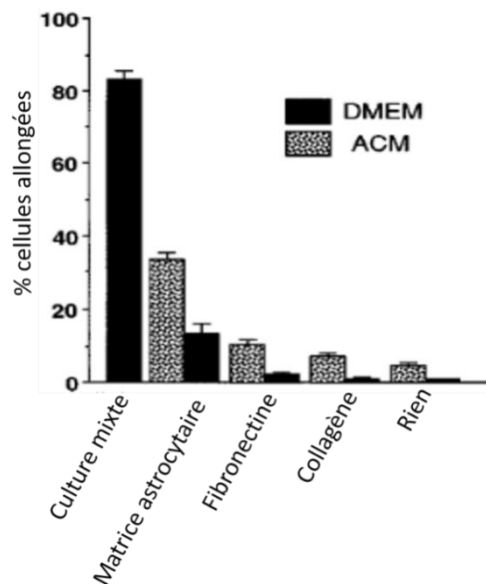


**Figure 3 :** L'activation microgliale s'accompagne de changements morphologiques. A) Plus la cellule va être activée plus elle adoptera une forme ronde et adaptera son fonctionnement. Si l'inflammation persiste, cette cellule atteindra son stade ultime d'activation et deviendra phagocytaire. B) Régression linéaire mettant en relation l'activation microgliale et la « rondeur » cellulaire ( $p < 10^{-8}$ ). Plus la cellule est ronde plus elle va sécréter de l'IL-1  $\beta$  (molécule pro inflammatoire). Figure adaptée de Fernández-Arjona et al., 2019.

Des changements morphologiques similaires sont observés lorsqu'on s'intéresse au vieillissement physiologique. Au cours du développement du système nerveux central, la microglie présente une morphologie bipolaire, permettant sa migration et la colonisation du système nerveux central. Par la suite ces cellules adoptent une morphologie ramifiée, que l'on observe généralement chez le jeune adulte (Cengiz et al., 2019). Au cours du temps, ces cellules vont adopter une forme ovoïde et présenter moins de ramification. Ce changement morphologique en fonction de l'âge est sûrement dû à un phénomène dit de « priming ». En effet tout au long de

notre vie, nous sommes exposés continuellement à des stimuli susceptibles d'activer nos cellules microgliales. L'addition de ces expositions fait que la microglie sera de moins en moins quiescente et aura des réponses inflammatoires disproportionnées par rapport au stimulus initiateur.

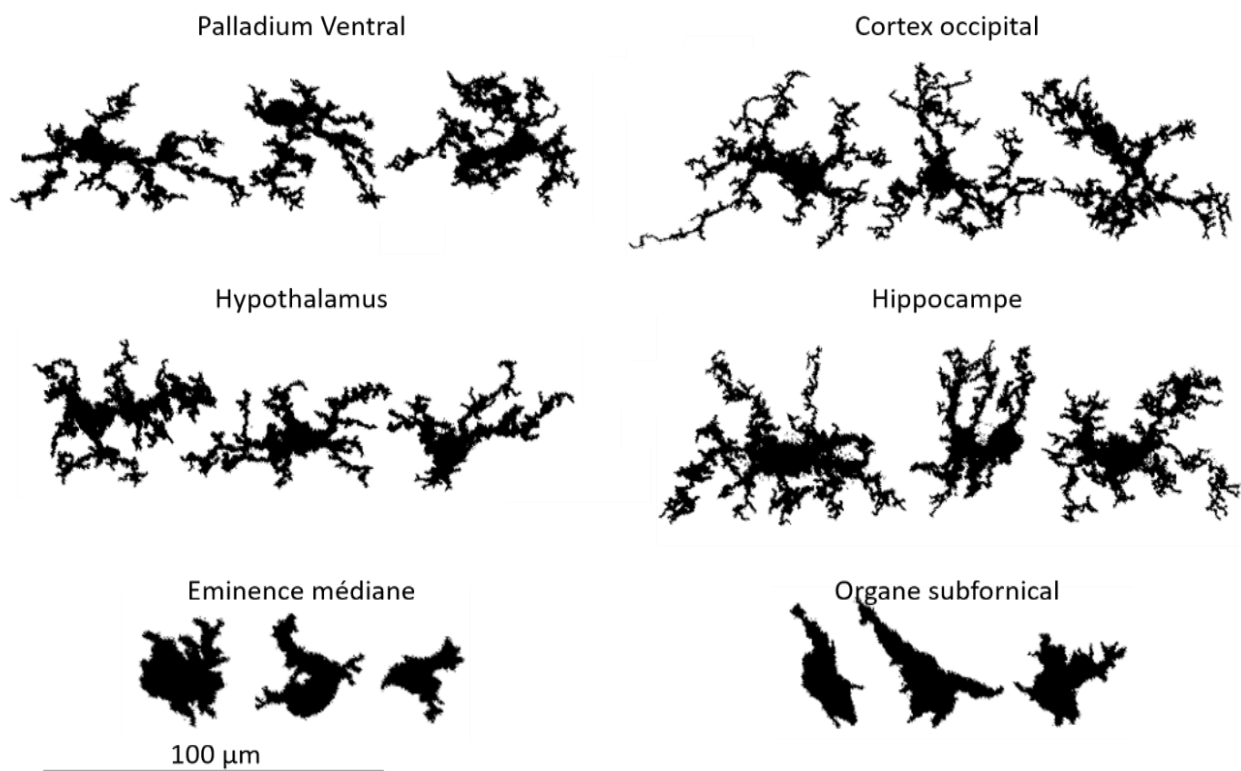
Il a été suggéré que le passage de la forme bipolaire à la forme ramifiée, après colonisation du SNC, est dû à la présence des astrocytes. En effet, dans une culture « pure » de microglie primaire, les cellules adoptent généralement une morphologie ronde, similaire à celles des macrophages périphériques. En revanche, si cette dernière est cultivée sur un tapis astrocytaire ou dans un milieu de culture conditionné par des astrocytes, la microglie adopte une morphologie ramifiée, semblable à ce qui peut être observé *in vivo* (Figure 4) (Tanaka et Maeda, 1996).



*Figure 4 : Proportion de cellules microglies primaires ramifiées en fonction des conditions de culture. En culture mixte (astrocyte-microglie), les cellules adoptent une morphologie ramifiée. La présence de molécules solubles libérées par les astrocytes (milieu conditionné par les astrocytes, ACM), maintient la microglie dans un état plus ramifié, signe de quiescence. Figure adaptée de Tanaka et Maeda, 1996.*



Bien qu'à l'âge adulte, la microglie au repos est ramifiée, on observe des variations morphologiques en fonction de la région cérébrale (Figure 5). Dans la substance grise, riche en corps cellulaires, elles sont ramifiées. Par contre, dans la substance blanche, riche en fibres nerveuses myélinisées, elles ont une morphologie bipolaire, avec des prolongements s'étendant le long des fibres nerveuses. Dans les régions dépourvues de BHE, comme par exemple au niveau de l'organe subfornical, elles sont plus arrondies, probablement de fait d'expositions répétées mais modérées faibles, à des stimuli activateurs (Figure 5) (Lawson et al., 1990). La densité en cellules microgliales est relativement identique dans les différentes régions de l'encéphale.

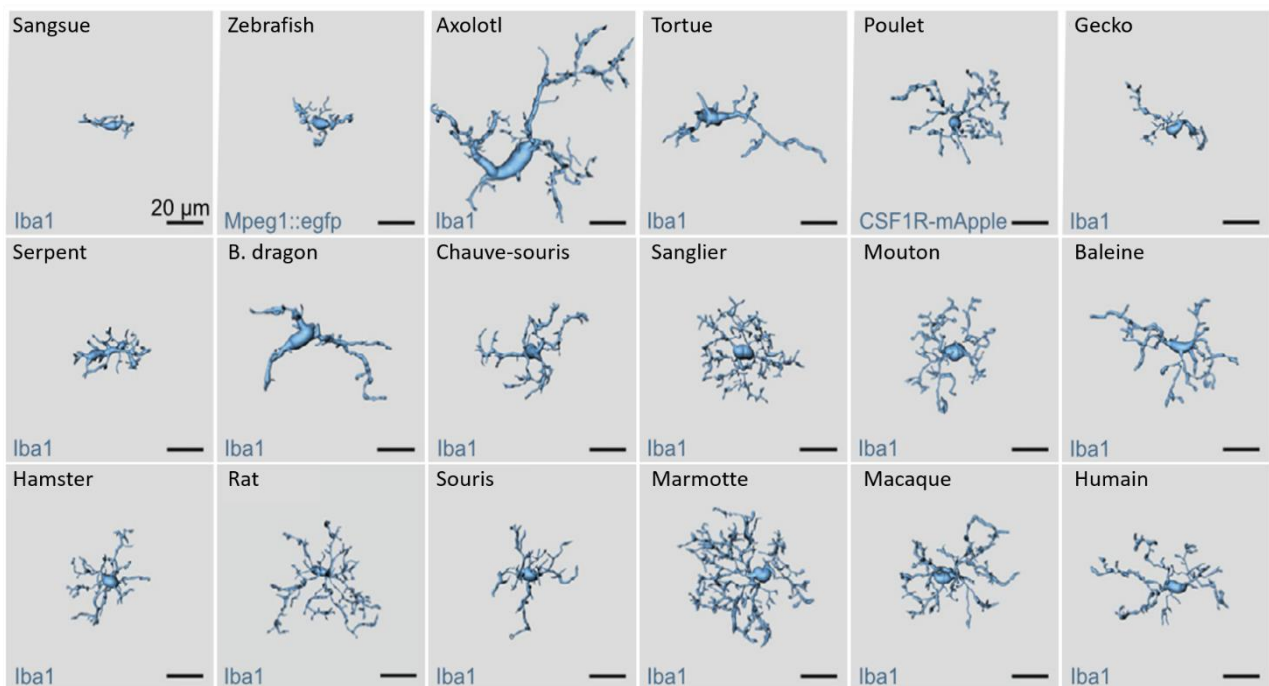


*Figure 5* : Caractéristiques anatomiques de cellules microgliales provenant de quatre régions distinctes du système nerveux central. En fonction des régions la morphologie des cellules change, mais elle reste de type ramifié. Adaptée de Lawson et al., 1990.

En temps normal, la microglie présente un ou plusieurs prolongements permettant de sonder l'espace environnant. D'abord décrites comme quiescentes, c'est-à-dire sans activité apparente, il s'avère que ces prolongements cytoplasmiques sont en perpétuel mouvement. Cela permet à la microglie d'agir en tant que sentinelle, d'interagir avec d'autres types cellulaires, et de réagir en cas de dérégulation (Lawson et al., 1990).

Au repos, c'est-à-dire sans stimuli activateurs, ces cellules participent au maintien de l'homéostasie du SNC. Elles sont caractérisées par la présence d'intégrine  $\alpha$ -M, appelée aussi CD11b, faisant partie de la famille des chaînes  $\alpha$  des intégrines. Il est à noter, qu'à l'état quiescent, la microglie n'exprime quasiment aucune molécule du complexe majeur d'histocompatibilité.

La microglie quiescente, ramifiée, représente le phénotype majeur de cellules microgliales d'un encéphale adulte sain. Ce phénotype est conservé chez tous les mammifères et s'observe également chez tous les cordés (Figure 6) (Geirsdottir et al., 2019).

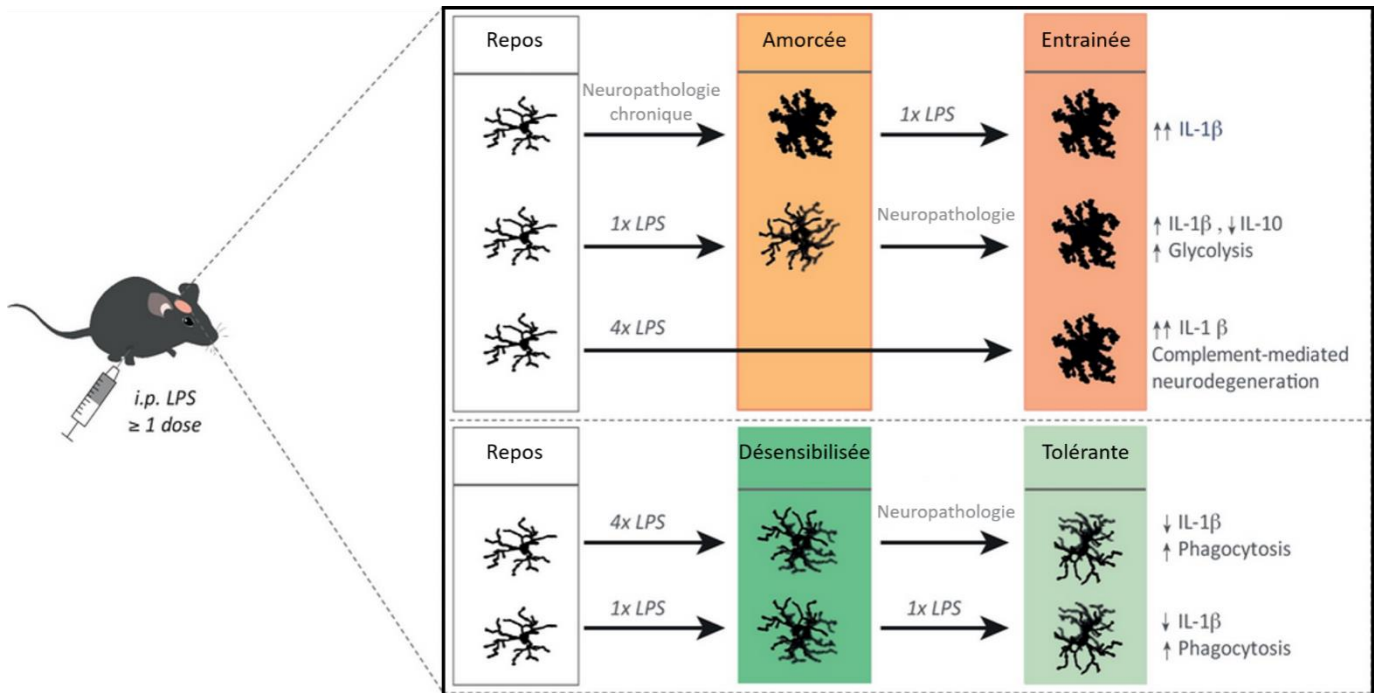


*Figure 6 : Reconstruction en 3D de la morphologie de cellules microgliales provenant de différentes espèces animales (Barre d'échelle 20  $\mu$ m), Figure adaptée de Geirsdottir et al., 2019.*

#### III.1.2.1.4 Activation des cellules microgliales

Lors d'une perturbation du système nerveux central, la réponse microgliale se fait très rapidement. Ces cellules, une fois activées, ont une forte capacité à proliférer, migrer et à s'accumuler aux sites de lésion.

Cloisonnée dans le SNC, à l'abri de toute perturbation périphérique en condition physiologique, la microglie n'est pas continuellement exposée à des stimuli activateurs (Neher et Cunningham, 2019). Une absence de mémoire immunitaire pour les cellules microgliales a donc été suggérée. Cependant, de récentes données remettent en question ce point. En effet, depuis les années 2000, le concept dit de « *priming* » microglial suggère que ces cellules peuvent adapter leurs réponses selon l'historique de leurs expositions à des substances activatrices. De tels changements ont un impact sur la progression de maladie du SNC. Par exemple, la neuroinflammation à « bas bruit », survenant avec l'âge, modifie la réponse microgliale. Un stimulus initial modifie la réponse et engendre une réaction plus forte (entraînement immunitaire), ou plus faible (tolérance immunitaire) à une neuroinflammation ultérieure. Démonstré dans des modèles murins et *in vitro*, cette présence de mémoire immunitaire microgliale chez l'être humain reste encore hypothétique (Figure 7) (Neher et Cunningham, 2019).



**Figure 7 : Priming Microgliale.** En fonction du décours temporel de l'exposition à des substances activatrices, la microglie va moduler sa réponse. Selon la condition, la microglie va amorcer sa réponse et la réponse suivante sera plus forte (entraînement immunitaire) ou alors elle sera désensibilisée et la réponse suivante sera plus faible (tolérance immunitaire). Figure adaptée de Neher et Cunningham, 2019.

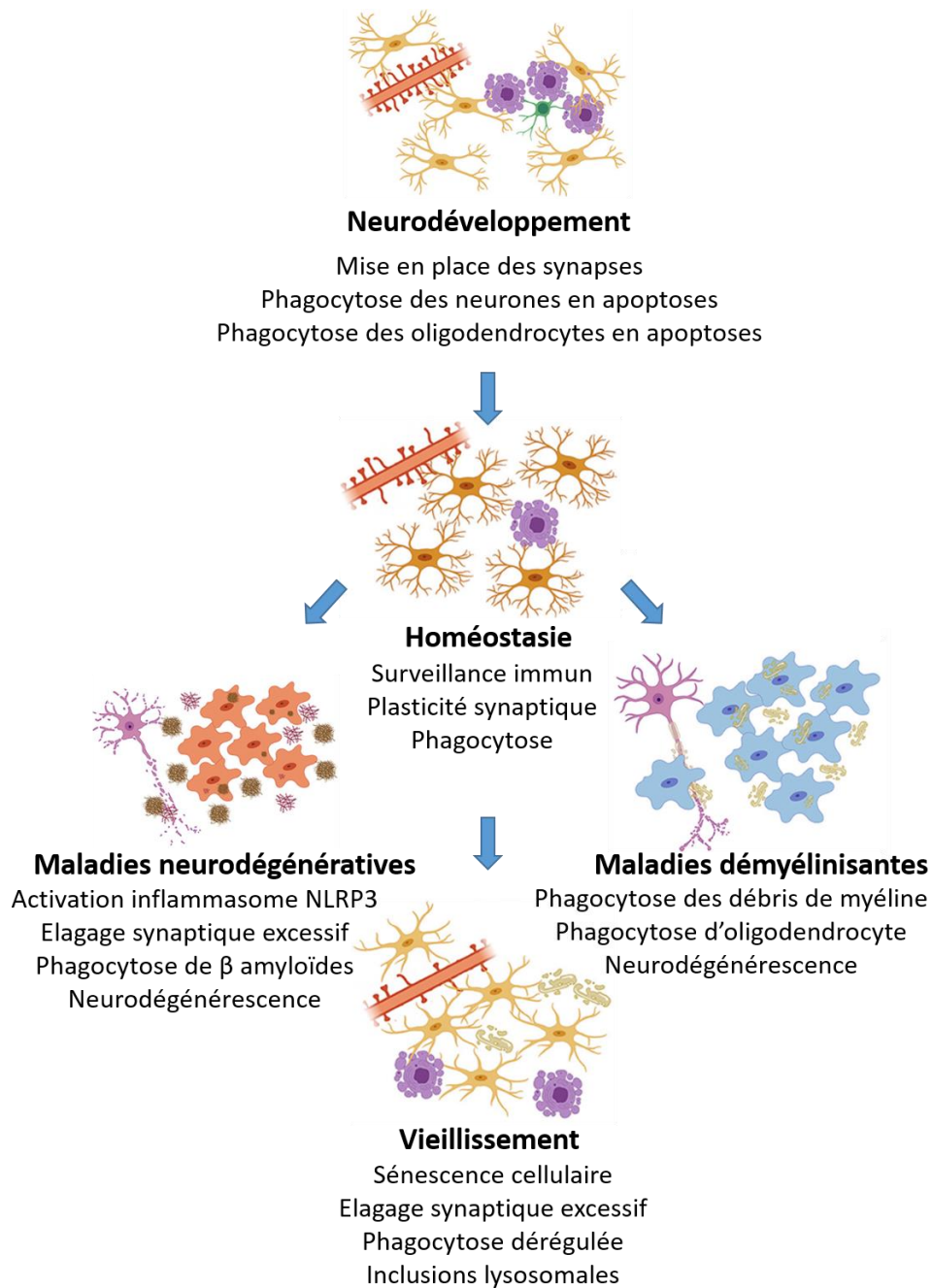
Bien que la réponse microgliale à un stimulus puisse être amorcée par les phénomènes de *priming* (Figure 7), cette activation reste tout de même séquentielle (Neher et Cunningham, 2019). Tout d'abord, la microglie va rétracter ses prolongements, va suivre une atrophie de son corps cellulaire, probablement due à une réorganisation du manteau d'actine cortical suite à la rétraction des prolongements cytoplasmiques (Abd-El-Basset et Fedoroff, 1995). Ces cellules ont alors une morphologie ronde, avec quelques rares et fins prolongements. L'expression de molécules telles que CD11b ou CD45 va également être amplifiée et induire l'expression de tout l'équipement protéique nécessaire à une présentation antigénique efficace. Dans l'état activé, les cellules microgliales sécrètent un éventail de molécules pro- ou/et anti-inflammatoires afin de réguler la réponse immunitaire. Enfin, selon les circonstances, leur état d'activation, et le degré de résorption de la neuroinflammation, ces cellules remplissent également une fonction

phagocytaire. La phagocytose microgliale n'intervient pas seulement en cas de dérégulation de l'homéostasie cérébrale mais également dans les stades précoces du neurodéveloppement (Figure 8) (Brown et Neher, 2014) (VanRyzin, 2021).

Lors du neurodéveloppement et à l'âge adulte (plasticité synaptique), la microglie va participer au développement et à la réorganisation du réseau neuronal (Figure 8). Les cellules microgliales vont surveiller les synapses et phagocyter celles qui sont dysfonctionnelles. De plus, durant le neurodéveloppement, elles participent aussi à la phagocytose de neurones et d'oligodendrocytes entrant en apoptoses (Galloway et al., 2019). Cette phagocytose précoce est également impliquée dans le *priming* microglial. Elle peut reprogrammer les cellules microgliales au niveau transcriptionnel, translationnel voire même épigénétique, comme c'est le cas pour les macrophages périphériques (Márquez-Ropero et al., 2020) (VanRyzin, 2021).

Plus le système nerveux central vieillit, plus elles vont être sollicitées par des dérèglements pathologiques et phagocyter des protéines comme les  $\beta$  amyloïdes (maladie d'Alzheimer) ou des débris de myélines (Figure 8). De plus, leur rôle dans la surveillance et la phagocytose des synapses sera altéré avec l'âge et deviendra excessif entraînant une sénescence cellulaire qui aura des répercussions fonctionnelles dans le système nerveux central (neurodégénérescence, inflammation chronique...) (Brown et Neher, 2014)(Galloway et al., 2019).

En devenant «hyper-réactives» en cas de lésion ou en situation de neuroinflammation répétée, les cellules microgliales sont indiscernables des macrophages périphériques sur les plans morphologiques et phénotypiques. Conservant les propriétés des stades d'activations précédents, elles assurent une fonction phagocytaire intense et sont éliminées par apoptose induite par leurs suractivations/activations intenses et répétées.



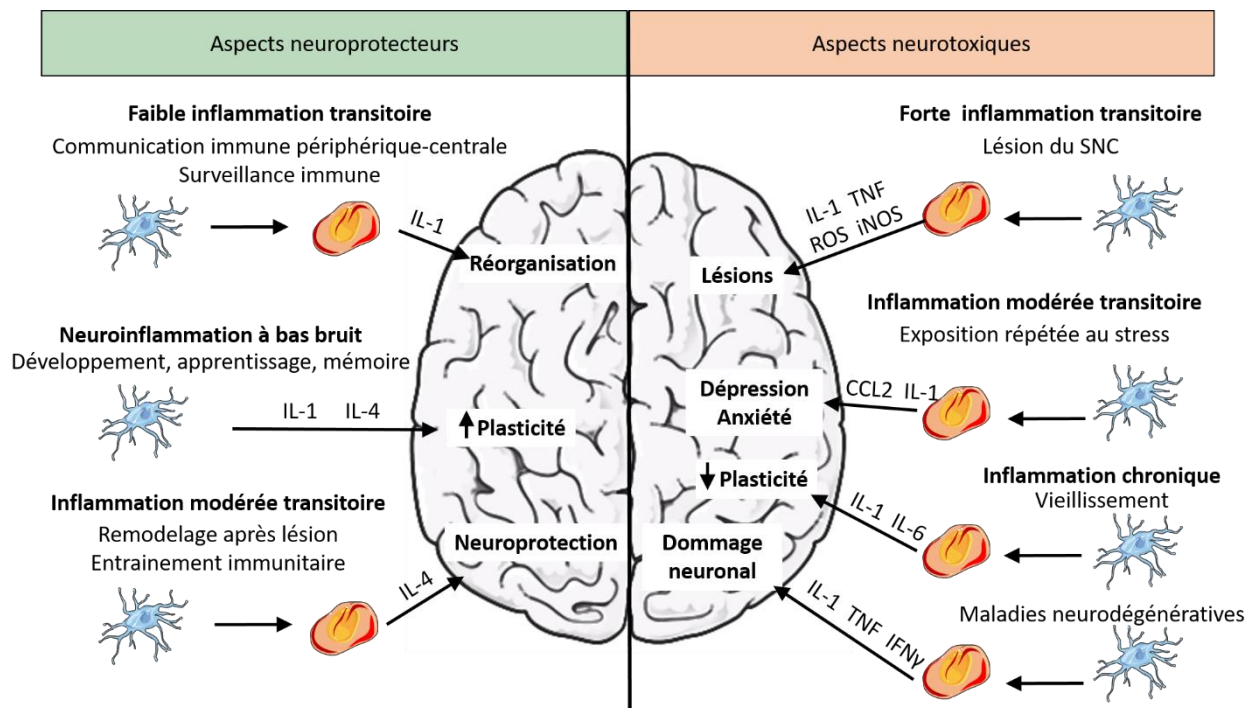
*Figure 8 : Fonctions microgliales en conditions physiologiques et pathologiques. La microglie a des fonctions diverses et variées. Elle est impliquée dans le neurodéveloppement et dans le maintien de l'homéostasie à l'âge adulte. Lors du vieillissement normal, ces fonctions vont être altérées et vont impacter le fonctionnement du SNC. En condition pathologique, ces cellules vont adapter leurs fonctions et participer au retour à la normale. Adaptée de Galloway et al., 2019.*

L'activation rapide de la microglie s'explique en partie par la diversité de récepteurs qu'elle exprime. L'ensemble de ces récepteurs permet :

- Une activation directe ou indirecte, respectivement, par les récepteurs de l'immunité innée ou par des cytokines sécrétées.
- Une activation par la détection d'un dysfonctionnement au sein du système nerveux central. Par exemple, une surabondance de neurotransmetteurs dans le milieu extracellulaire, après lyse neuronale. La microglie exprime les récepteurs  $\beta$  adrénergiques et sa stimulation active la microglie. L'activation microgliale (changement morphologique et prolifération) en cas de stress chronique est médiée par la noradrénaline libérée par les neurones. De plus, un bloquant des récepteurs  $\beta$  adrénergiques bloque cette activation, alors que bloquer les récepteurs  $\alpha$  ne montre aucun effet ([Sugama et al., 2019](#)) ([Sugama et Kakinuma, 2021](#)). D'autres récepteurs aux neurotransmetteurs sont exprimés par la microglie, permettant de sonder l'activité neuronale et d'induire leur activation ([Liu, Leak et Hu, 2016](#)).

### III.1.2.1.5 Fonctions microgliales

L'activation microgliale a longtemps été considérée comme néfaste pour les neurones, et donc leur étude a été biaisée en ce sens. La compréhension et l'étude de chaque type cellulaire indépendamment et en synergie avec les autres, a démontré que finalement la microglie a un rôle plus fondamental. En effet, sans stimulus activateur les cellules microgliales sont neuroprotectrices (Figure 9). Ce n'est que dans le cas d'une activation intense et répétée ou dans le cas de leur dysfonctionnement qu'elles engendrent des dommages neuronaux dans le SNC (Figure 9) (Szepesi et al., 2018).



**Figure 9 :** Aspects neuroprotecteurs et neurotoxiques de la neuroinflammation. En fonction des stimuli et de leur durée et intensité, la neuroinflammation peut être bénéfique (effet neuroprotecteur, augmentation de la plasticité cérébrale...) ou néfaste (lésions, troubles cognitifs, diminution de la plasticité cérébrale...).

L'implication des cellules microgliales dans la communication neuronale n'a été identifiée que récemment. En effet, le dogme d'une activation microgliale néfaste causant des dommages neuronaux a longtemps fait taire les hypothèses d'interaction réciproques bénéfiques (Szepesi et



al., 2018). Récemment, il a été montré que la microglie et les neurones sont en relation étroite. Ils communiquent activement par le milieu extracellulaire ou directement par des canaux-jonctionnels (gaps junctions) afin d'assurer la réparation et l'homéostasie du SNC (Szepesi et al., 2018).

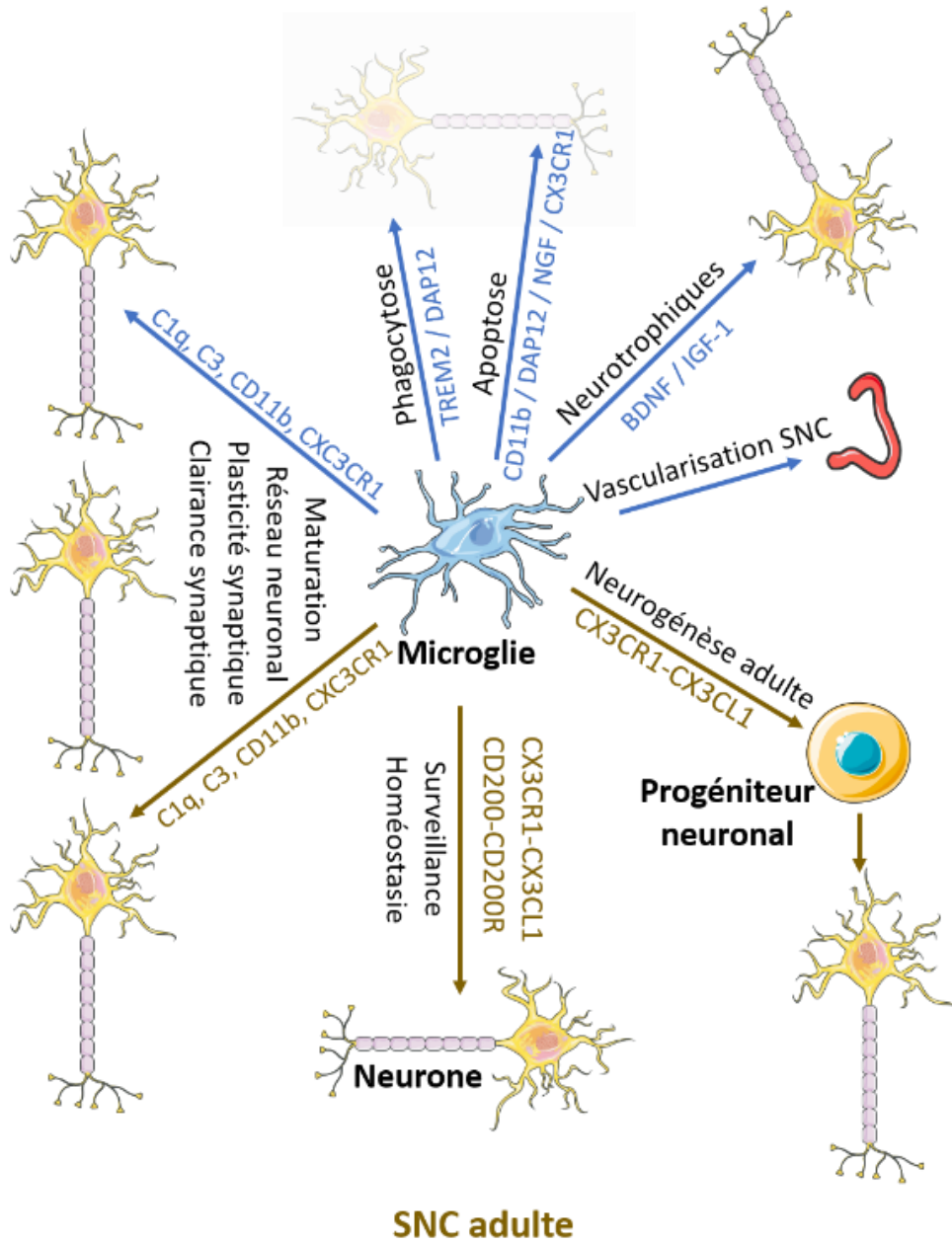
Cette synergie avec les cellules nerveuses maintient les cellules microgliales dans leur état quiescent. Lorsqu'elle est interrompue ou perturbée, les cellules microgliales sont rapidement activées afin d'isoler et de protéger les neurones de leur environnement «néfaste». Si cette action protectrice est un échec, ou si la présence locale de cytokines proinflammatoires est trop importante, les cellules microgliales atteignent des stades d'activation plus importantes et potentiellement dommageables pour les neurones et le système nerveux central (Szepesi et al., 2018).

#### III.1.2.1.6 Microglies et fonctions physiologiques

Cette morphologie ramifiée, caractéristique des cellules microgliales, ainsi que la multitude de récepteurs qu'elles expriment, leur permet d'interagir avec toutes les autres cellules du SNC et d'être pleinement intégrées dans le réseau nerveux. La microglie participe donc activement à diverses fonctions physiologiques comme, par exemple, l'élagage synaptique qui permet un remodelage des connections synaptiques, le maintien de l'homéostasie au sein du SNC ou encore la sécrétion de divers facteurs neuromodulateurs (Figure 9) (Figure 10) (Audinat et Arnoux, 2014). L'élagage synaptique est d'une importance particulière lors du neurodéveloppement et dans l'apprentissage. Ce phénomène se caractérise par une phagocytose totale ou partielle d'éléments synaptiques, en particulier les boutons présynaptiques. Cette phagocytose reste cependant physiologique, ne nécessitant pas une activation microgliale (Audinat et Arnoux, 2014).

Un défaut d'élimination synaptique durant le développement néonatal entraîne une désorganisation des circuits neuronaux. Ces défauts vont conduire à des situations pathologiques telles que les troubles du spectre autistique (TSA) ou des maladies psychiatriques (trouble de l'humeur, dépression, troubles bipolaires... (Konishi, Kiyama et Ueno, 2019).

## SNC en développement



*Figure 10 : Fonction microgliale en condition physiologique, lors du neurodéveloppement et à l'âge adulte.*

#### III.1.2.1.7 Surveillance microgliale en condition physiologique

La fonction principale de la microglie quiescente dans le cerveau adulte est de réguler l'homéostasie du parenchyme cérébral (Figure 10). Cette surveillance se fait grâce à une grande diversité de protéines réceptrices et de signalisations exprimées à la surface de ces cellules. Parmi ces protéines on peut citer : des récepteurs à des neurotransmetteurs ou des neuropeptides, à des chimiokines ou des cytokines, ainsi que des récepteurs qui reconnaissent des motifs moléculaires associés aux dégâts cellulaires (DAMPs pour Damage Associated Molecular Pattern) présents sur les prolongements des cellules microgliales (Liu, Leak et Hu, 2016) (Gebicke-Haerter et Norgauer, 2001). La surveillance ne se fait pas en continu. Lors des phases statiques, la microglie établit des contacts avec les cellules nerveuses voisines. Cependant, lors de phases actives, la microglie sécrète divers facteurs modulateurs (facteurs de croissance, protéines pro- ou anti-inflammatoires...).

En fonction de la région subcellulaire où se fait le contact entre le prolongement microglial et le neurone, différents effets sont possibles (Lin et al., 2021) :

- Région somatique : Une libération d'ATP par le neurone stimule les récepteurs purinergiques métabotropes (P2Y<sub>12</sub>) exprimés par la cellule microgliale. L'activation de ce récepteur favorise la survie du neurone. Une inhibition de ce récepteur diminue la durée du contact et supprime ses effets neuroprotecteurs (Cserép, et al., 2020) (Haynes et al., 2006).
- Région synaptique : Fréquent et dépendant de l'activité électrique neuronale, ce contact va être impliqué dans l'élagage synaptique et la genèse de nouvelles épines dendritiques. Cette conversation cellulaire fait intervenir les récepteurs purinergiques métabotropes (P2Y<sub>12</sub>) (Haynes et al., 2006).
- Segment initial de l'axone : Une décharge neuronale soutenue va promouvoir l'enroulement des prolongements microgliaux autour de l'axone et ainsi inhiber son excitabilité. L'inhibition de la motilité microgliale, diminue sa capacité à réguler la décharge neuronale et facilite les dommages liés à l'excitotoxicité (Haynes et al., 2006).

De plus, il existe une surveillance à l'échelle nanométrique. Grâce aux filopodes, des prolongements cytoplasmiques extrêmement fins, la microglie peut scruter rapidement la

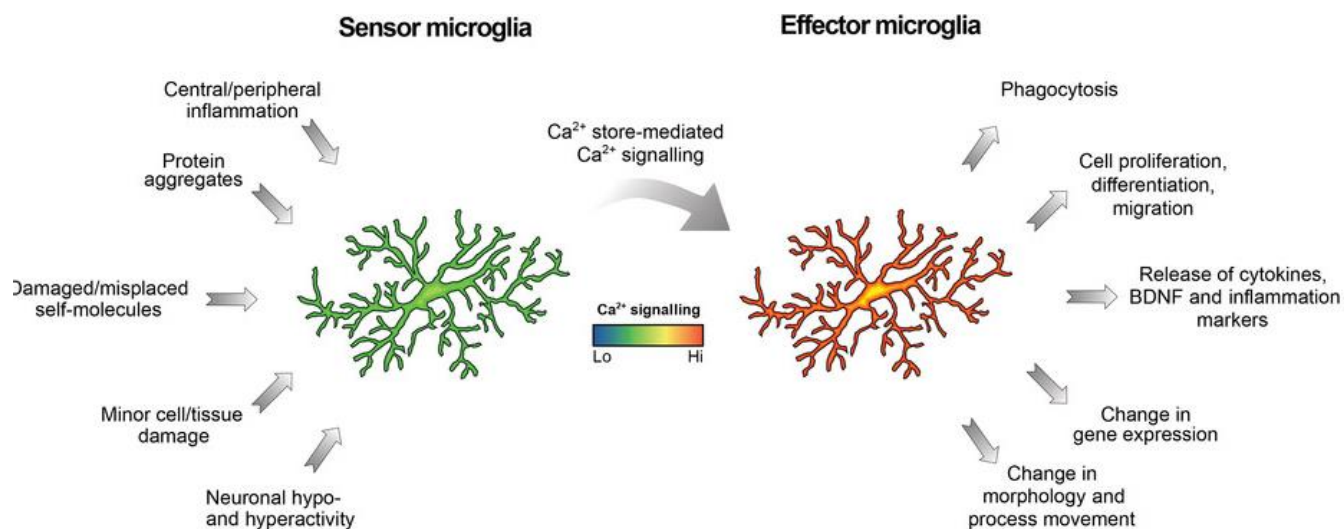
matrice extracellulaire environnante. Cette surveillance, actine-dépendante, est contrôlée par l'AMP cyclique. Une activation du récepteur purinergique métabotrope P2Y12 entraîne un effondrement des filopodes. La présence de filopodes donne aux prolongements microgliaux un aspect de pinceau et leur formation peut précéder une transition morphologique vers une cellule ronde, signe d'activation microgliale (Haynes et al., 2006) (Audinat et Arnoux, 2014) (Lin et al., 2021).

#### III.1.2.1.8 La surveillance microgliale est calcium dépendante

L'activation des cellules microgliales suite à la stimulation des divers récepteurs membranaires est en générale traduite en des changements dans la concentration de seconds messagers intracellulaire (calcium libre, AMPc, NO,...). La concentration de calcium libre intracellulaire ( $[Ca^{2+}]_i$ ) est un signal d'importance fondamentale dans la régulation de l'activation microgliale (Figure 11) (Pan et Garaschuk, 2022) (Brawek et Garaschuk, 2013). Cette signalisation intracellulaire se fait principalement par des récepteurs métabotropes qui vont engendrer une libération calcique depuis le réticulum plasmique ainsi qu'une entrée de calcium par le milieu extracellulaire.

En complément à l'entrée massive de calcium dans le cytoplasme de la cellule microgliale (entrée par le milieu extracellulaire, mais également par les stocks du réticulum endoplasmique), on observe aussi des variations locales de calcium dans le cytoplasme.

Ces élévations locales de calcium sont permises par des zones de contacts entre les membranes, limitant aussi la diffusion du calcium dans toute la cellule. Ces microdomaines à forte concentration calcique sont impliqués dans les processus d'extension et de rétraction des prolongements cytoplasmiques et dans la surveillance de la matrice extracellulaire (Guse, Gil Montoya et Diercks, 2021). Les élévations de calcium locales et globales semblent donc primordiales pour la surveillance, la motilité cellulaire et l'extension des processus cytoplasmiques (Guse, Gil Montoya et Diercks, 2021).

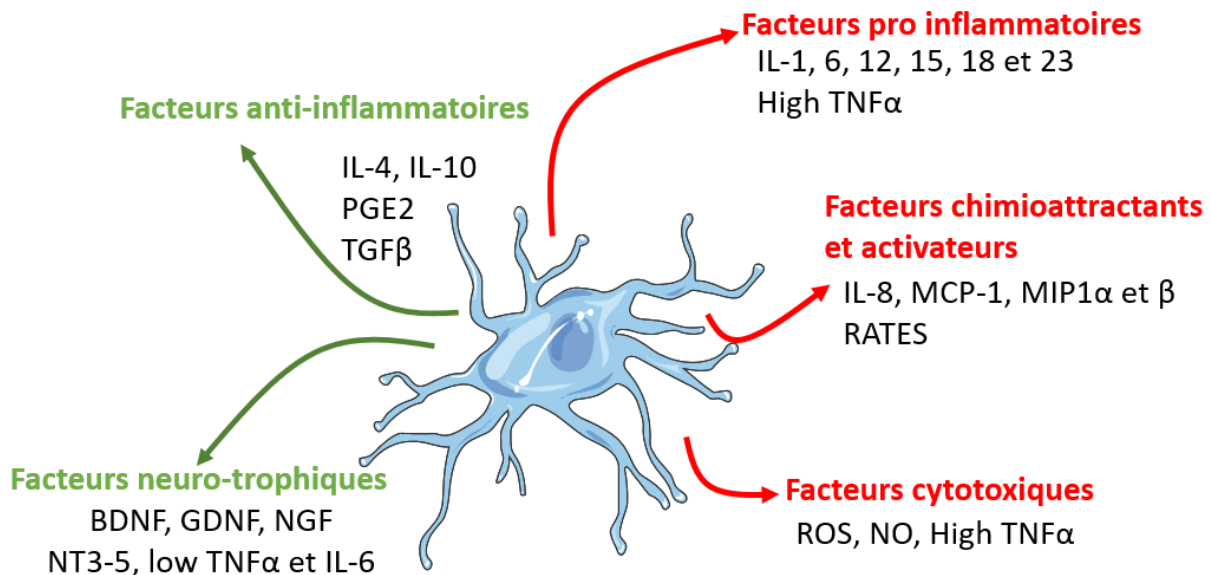


*Figure 11 : Calcium et cellules microgliales. A l'état quiescent, le niveau cytoplasmique de calcium est faible. Lors d'une activation microgliale, le calcium cytoplasmique augmente permettant l'activation de plusieurs processus cellulaires (phagocytose, prolifération, différenciation, migration, sécrétions de cytokines, expressions géniques, changements morphologiques) (Pan et Garaschuk, 2022).*

### III.1.2.1.9 Chef d'orchestre de la réponse neuroinflammatoire

Les cellules microgliales, une fois activées, vont dans un premier temps proliférer et migrer vers le site de la lésion. Les raisons précises et les molécules impliquées dans cette chimiotaxie ne sont pas encore totalement connues, cependant les neurotransmetteurs, l'ATP ou même des ions tels que le calcium peuvent intervenir dans cette attraction. En effet les cellules microgliales sont équipées de récepteurs aux neurotransmetteurs (Liu, Leak et Hu, 2016) et aux chimiokines (Gebicke-Haerter et Norgauer, 2001), leur permettant de répondre à un grand nombre de molécules présentes dans l'environnement extracellulaire.

Une fois arrivées au site de lésion, elles vont présenter le ou les antigène(s) d'importance à des cellules immunitaires infiltrantes et sécréter des facteurs inflammatoires (Figure 12).



*Figure 12 : Facteurs sécrétés par les cellules microgliales.*

En cas de neuroinflammation, la microglie devient une source importante de facteurs neurotoxiques et/ou neuroprotecteurs (Figure 12). De plus, les effets de ces cytokines peuvent être bénéfiques ou néfastes en fonction de leur nature chimique, mais également de la dose et de la durée d'exposition au stimulus. Par exemple, en condition physiologique, l'interleukine-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) module la transmission synaptique dans le SNC, lui permettant, de réguler la prise alimentaire ou le sommeil (Jewett et Krueger, 2012). En cas d'activation microgliale pathologique,

entraînant une neuroinflammation, ces cellules deviennent une source importante d'IL-1. Cette interleukine, dont la concentration extracellulaire augmente subitement, entraîne la production de facteurs inflammatoires tel que le TNF  $\alpha$ , l'IL-6 ou encore l'expression intracellulaire de cyclooxygénases (Terrando et al., 2010). Dans un modèle murin d'endotoxémie, lorsque la signalisation l'IL-1 $\beta$  est bloquée par l'IL-1 *receptor antagonist* (IL-1ra), la sécrétion de molécules pro-inflammatoires est diminuée (Terrando et al., 2010). Cette initiation de la libération de molécules inflammatoires, place IL-1 en première ligne de la réponse inflammatoire dans le SNC.

#### III.1.2.1.10 Les sécrétions microgliales activent les astrocytes

Des études *in vitro* montrent que l'activation astrocytaire est médiée par l'IL-1  $\beta$ , cytokine soluble, sécrétée par les microglies en condition neuroinflammatoire. En présence d'IL-1  $\beta$ , les astrocytes prolifèrent et participent activement à la réponse immunitaire (Herx et Yong, 2001). Des études, réalisées sur des cultures mixtes astrocytes-microglies, démontrent une activation microgliale en amont de l'activation astrocytaire. En effet, on observe d'abord une augmentation des ARN messagers des molécules immunes dans la microglie et ensuite dans un deuxième temps dans les astrocytes (Tanga, Raghavendra et DeLeo, 2004). De même, dans un modèle murin de dépression, Li et al., ont montré que l'assemblage de l'inflammasome NLRP3 (*NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3*) est un prérequis pour l'activation astrocytaire, vers un phénotype A1, décrit comme neurotoxique et proinflammatoire (Li et al., 2022). D'autres molécules, dont la fonction primaire n'est pas l'initiation et la propagation de l'inflammation vont également participer à l'activation astrocytaire. Ainsi l'ATP, va d'abord être libérée dans le milieu extracellulaire par les cellules microgliales, ce qui va induire dans un deuxième temps la libération d'ATP par les astrocytes (Pascual et al., 2012). L'ATP va activer le récepteur P2Y1 astrocytaire et augmenter les courants post synaptiques excitateurs aux synapses neuronales (Pascual et al., 2012).

#### III.1.2.1.11 Les astrocytes

Le terme astrocyte a été introduit en 1893, en référence à des cellules gliales ayant une morphologie, très ramifiée, en forme d'étoile (Lenhossék, 1893). D'origine neuroectodermique, les astrocytes sont les cellules gliales les plus abondantes du SNC et représentent environ 30% de l'ensemble des cellules gliales du système nerveux central (Verkhratsky, Zorec et Parpura, 2017). Le pourcentage d'astrocyte varie d'une région à l'autre du SNC et ainsi qu'au sein d'une même

structure encéphalique ([Verkhatsky, Zorec et Parpura, 2017](#)). Par exemple, chez le macaque rhésus, dans les couches corticales superficielles (couches 1 à 3) il y a plus d'astrocytes (57%) que dans les couches profondes (couche 4) où la myélinisation est plus importante (30% astrocytes, 62% oligodendrocytes, 8% microglies) ([Peters, Verderosa et Sethares, 2008](#)).

Tout comme les cellules microgliales, ces cellules peuvent présenter différentes morphologies, selon leur état fonctionnel. Les astrocytes peuvent être dans un état «quiescent» (état de repos en absence de tout stimulus perturbateur) ou activés. De plus leur morphologie peut varier en fonction du stade de développement du SNC. L'expression des filaments intermédiaires, de vimentine et de la protéine d'acides fibrillaires gliales (GFAP), qui forme le cytosquelette des astrocytes, varie lors de la mise en place du SNC. A des stades précoces par exemple, l'expression de vimentine est favorisée par rapport à celle de la GFAP ([Zhou, Zuo et Jiang, 2019](#)).

Tout comme la microglie, la morphologie des astrocytes est plus ou moins ramifiée selon la structure cérébrale où ils résident. De plus, un marquage astrocytaire (GFAP) montre très peu de chevauchement dans les territoires tissulaires couverts par des astrocytes voisins, chaque astrocyte occupe un territoire qui lui est propre ([Sofroniew et Vinters, 2010](#)).

Les astrocytes ont tout d'abord été considérés comme des cellules n'ayant que des fonctions de support et étaient incapables de générer et de propager des potentiels d'actions (PA). De nos jours, il est clairement établi que ces cellules ont d'autres fonctions ([Hart et Karimi-Abdolrezaee, 2021](#)). En effet, même s'ils ne génèrent pas de PA, ils communiquent entre eux et avec d'autres types cellulaires du SNC, grâce à des échanges de calcium intracellulaire via des jonctions communicantes ([Poskanzer et Molofsky, 2018](#)) et grâce à la libération de messagers extracellulaires dont l'ATP ([Haydon et Carmignoto, 2006](#)). Il a, par exemple, été observé que les oscillations de calcium libre intracellulaires dans les astrocytes pouvaient être déclenchées par l'activité neuronale. Plus ils sont actifs et stimulés, plus les oscillations calciques dans les astrocytes seront importantes ([Poskanzer et Molofsky, 2018](#)).

Finalement, les astrocytes représentent aussi des intermédiaires importants entre la circulation sanguine et le système nerveux central. En effet certains astrocytes, dit périvasculaires, ont des prolongements moins denses en GFAP en contact direct avec les capillaires.



Ils jouent également un rôle crucial dans la maintenance de la BHE. Les astrocytes maintiennent l'intégrité de la BHE en régulant sa perméabilité et en sécrétant des molécules qui influencent sa formation lors du développement et sa stabilité. Un dysfonctionnement des fonctions astrocytaires peut altérer l'homéostasie de la BHE et contribuer au développement de nombreuses pathologies du SNC. Cette organisation spatiale oblige la majorité des molécules présentes dans le sang, à traverser les cellules endothéliales et enfin les astrocytes avant de pouvoir infiltrer le SNC (Zhou, Zuo et Jiang, 2019).

Les processus astrocytaires englobent également les synapses neuronales, suggérant un rôle dans la transmission de l'information nerveuse.

#### III.1.2.1.12 Morphologies des astrocytes

Les astrocytes peuvent être classifiés selon des critères morphologiques, dépendant de la région cérébrale :

- Les astrocytes protoplasmiques, présents essentiellement dans la substance grise qui est riche en corps cellulaires neuronaux et pauvre en fibres (axones de neurones de projection). Ils présentent de nombreuses courtes ramifications.
- Les astrocytes fibreux, présents dans la substance blanche qui est riche en fibres nerveuses (axones de neurones de projection). Ces cellules ont moins de ramifications, mais elles sont plus allongées.

Lors d'une activation astrocytaire, appelée astrogliose, ces cellules adaptent leur morphologie. Un astrocyte réactif a un corps cellulaire plus petit et des prolongements plus nombreux. Après activation, ils participent activement à la réponse immunitaire (Zhou, Zuo et Jiang, 2019).

#### III.1.2.1.13 Les astrocytes en condition physiologique

En plus de leur rôle de support physique, les astrocytes ont également de nombreuses autres fonctions dans le SNC (Figure 13) :

- Métabolisme énergétique : Ces cellules sont impliquées dans le transport actif de glucose, la synthèse et le stockage de glycogène et autre substrats énergétiques ainsi que le métabolisme des acides gras. Elles servent ainsi de compartiments métaboliques capables

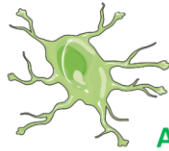
de très rapidement mobiliser et fournir des substrats énergétiques aux neurones et à d'autres types cellulaires (Camandola, 2018) (Hart et Karimi-Abdolrezaee, 2021).

- Homéostasie : hydrique, ionique et oxydative (Hart et Karimi-Abdolrezaee, 2021)
- Barrière hématoencéphalique : Ils participent à la formation de la BHE et au transport actif de glucose et d'autres molécules essentielles véhiculées par la circulation générale (Hart et Karimi-Abdolrezaee, 2021).
- Communication : Les astrocytes communiquent par des variations de calcium intracellulaire qu'ils peuvent transmettre aux astrocytes voisins par des contacts directs grâce au Gap jonction ou indirect en libérant des molécules diffusibles dans l'espace extracellulaire, comme par exemple l'ATP (Haydon et Carmignoto, 2006).

De plus, ils peuvent interagir avec d'autres cellules par l'intermédiaire des gliotransmetteurs sécrétés.

Finalement ils participent directement à la transmission synaptique : en délimitant la fente synaptique et en recaptant les neurotransmetteurs libérés. On a désigné sous le terme de «synapse tripartite» l'ensemble composé de l'élément présynaptique, de l'élément post-synaptique et des prolongements astrocytaires qui délimitent la synapse (Hart et Karimi-Abdolrezaee, 2021).

- Synatpogénèse et maturation synaptique
- Modulation de la transmission synaptique
- Support trophique et métabolique
- Capture et recyclage de neurotransmetteurs
- Intégrité de la BHE et circulation sanguine
- Homéostasie ionique et hydrique
- Phagocytose (synapse)



**Astrocyte sain**

Amyloïdes  $\beta$   
Age  
Sexe  
Fonds génétiques



**Astrocyte réactif**

- Phagocytose de peptides  $\beta$  amyloïdes
- Rupture de la perméabilité de la BHE
- Excitotoxicités (Glutamate)
- Communications cellule-cellule altérées
- Changements morphologiques (GFAP +++)
- Sécrétion de cytokines
- Neurotoxique

**Figure 13** : Fonction astrocytaire en condition physiologique (sain) et inflammatoire (réactif).

L'astrocyte intervient dans de nombreuses situations allant du neurodéveloppement à l'élimination par phagocytose de peptides  $\beta$  amyloïdes qui s'accumulent dans le milieu extracellulaire lors de diverses pathologies neurodégénératives dont la prévalence augmente avec l'âge.

Les astrocytes sont des support trophiques et énergétiques pour les neurones en leur fournissant les métabolites nécessaires à leur fonctionnement optimal mais également en servant de barrière ou de lieu de passage privilégié pour les molécules qui proviennent de la circulation sanguine et qui doivent transiter par les astrocytes avant d'arriver dans le système nerveux central et aux neurones. De plus ils interviennent dans l'élimination de synapses surnuméraires (lors du développement) ou non-fonctionnelles ainsi que dans la modulation de la neurotransmission. Ils vont par exemple participer à la recapture des neurotransmetteurs libérés dans la fente synaptique par le neurone présynaptique.

Lors de la progression d'une pathologie comme la maladie d'Alzheimer ou le vieillissement physiologique, les astrocytes deviennent réactifs et leur fonction homéostatique devient dysfonctionnelle. La communication avec les neurones est altérée, la recapture des neurotransmetteurs ne se fait plus de manière efficace et l'excédent de glutamate risque d'induire une excitotoxicité dans les neurones postsynaptiques. De même, leur rôle de support est altéré et des ruptures plus ou moins importantes et plus ou moins locales de la BHE peuvent se produire, permettant ainsi à certaines molécules périphériques normalement incapables de traverser la BHE d'entrer dans le système nerveux central. C'est le passage vers l'encéphale de ces molécules, potentiellement dommageables, qui vont entretenir et aggraver le dysfonctionnement cérébral (neuroinflammation).

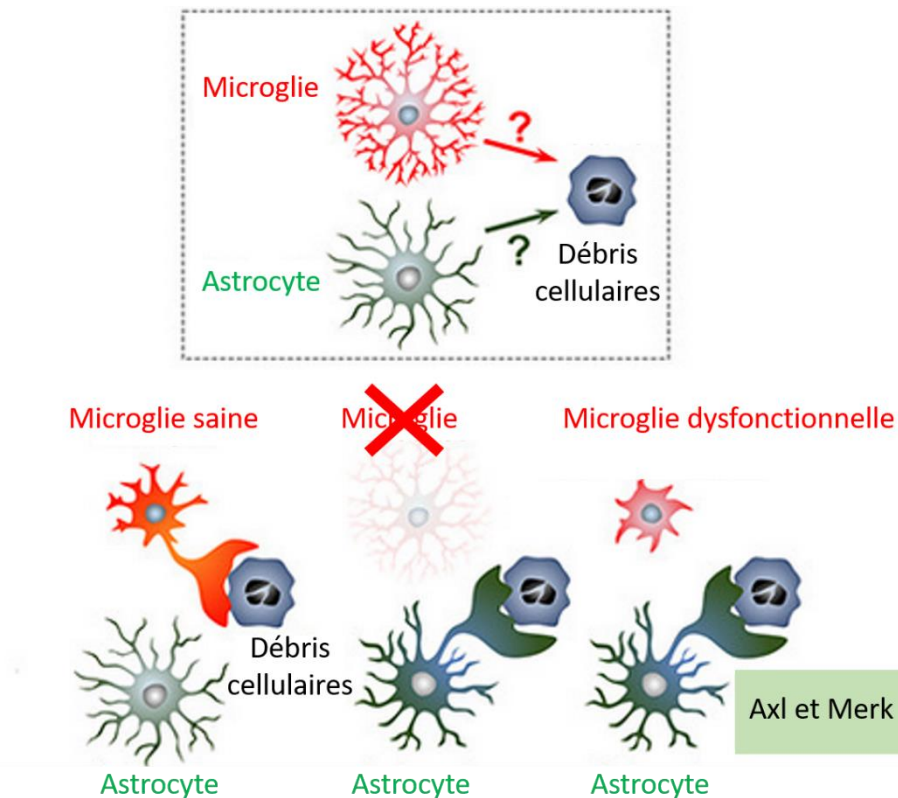
#### III.1.2.1.14 Les astrocytes dans la neuroinflammation

La neuroinflammation est un processus généralement attribué à des cellules d'origine myéloïde (lymphocytes, macrophages et cellules microgliales) (Jordão et al., 2019). Cependant, les astrocytes contribuent également à cette réaction (Figure 13). L'activation astrocytaire s'appelle astrogliose réactive : les astrocytes prolifèrent abondamment, leurs corps cellulaires s'hypertrophient et ils synthétisent et sécrètent toute une panoplie de molécules solubles et membranaires (Jurga et al., 2021). Ainsi, lors d'une stimulation au LPS les astrocytes libèrent, à l'image des microglies, des molécules proinflammatoires comme la chimiokine CXCL10 ou CCL2 qui va pouvoir propager le signal inflammatoire aux cellules voisines exprimant les récepteurs aux chimiokines (microglies, oligodendrocytes, astrocytes et neurones...) (Linnerbauer, Wheeler et Quintana, 2020), ou l'enzyme iNOS qui intervient dans la production du monoxyde d'azote (NO) (Jurga et al., 2021). Ces astrocytes réactifs vont également pouvoir migrer par chimiotactisme vers le site lésé pour former localement une «cicatrice gliale» (Adams et Gallo, 2018).

#### III.1.2.1.15 Lorsque la microglie est déficiente, les astrocytes prennent le relais

Des études récentes réalisées sur des modèles murins montrent qu'une ablation des cellules microgliales ou un dysfonctionnement de la microglie engendre un recrutement et une activation astrocytaire en dehors de tout contexte inflammatoire (Figure 14) (Konishi et al., 2020). Si la capacité de la microglie à phagocyter est bloquée, comme dans la lignée de souris *Irf8<sup>-/-</sup>*, les astrocytes assurent la fonction phagocytaire. Ces résultats suggèrent que même dans un environnement physiologique les astrocytes peuvent participer activement à la phagocytose et donc de maintenir/garantir la fonction de la détoxification du SNC (Konishi et al., 2020) grâce à l'expression des récepteurs Axl et Merk qui font partie de la famille des récepteurs TAM (Tyro3-Axl-Mer) (Figure 14). Ces récepteurs à activité tyrosine kinase ne participent pas au développement mais sont impliqués dans le maintien de l'homéostasie à l'âge adulte. Les récepteurs TAM et leurs ligands (Gas6 et la protéine S) sont essentiels pour la phagocytose de cellules apoptotiques (Lemke, 2013).

Ces récepteurs sont finement régulés ; une surexpression conduit au développement de cancers et leurs dysfonctionnements à un état inflammatoire chronique (Lemke, 2013).



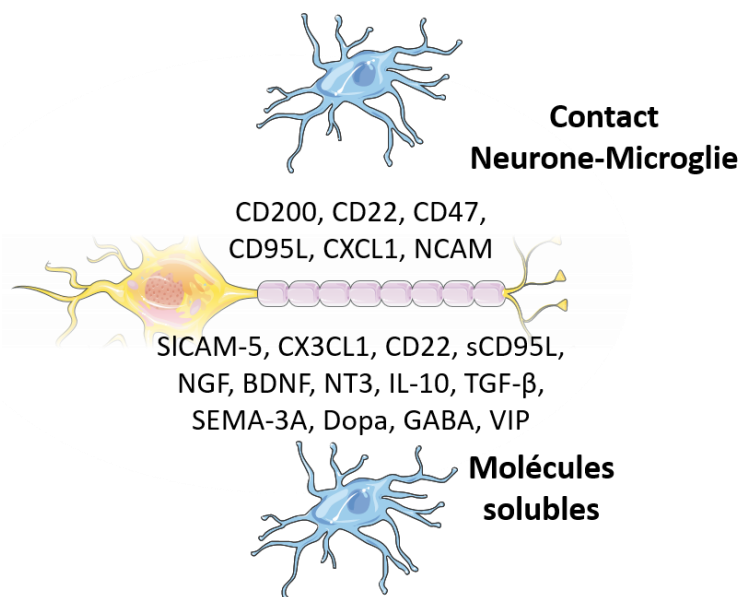
*Figure 14 : Lorsque la microglie est déficiente les astrocytes prennent le relais pour maintenir l'homéostasie du système nerveux central. En condition physiologique, la microglie phagocyte les débris cellulaires. Lorsque la microglie est absente ou dysfonctionnelle (Irf8 KO par exemple), les astrocytes, non réactifs prennent le relais. En effet les astrocytes expriment Axl et Merk, qui sont impliqués dans la reconnaissance et la phagocytose des débris cellulaires. Adaptée de Konishi et al., 2020.*

### III.1.2.2 Les neurones

Pendant près d'un siècle, l'étude des neurones s'est focalisée sur leurs fonctions de genèse, de propagation et de transmission de l'information nerveuse sous forme de signaux électriques. Leur rôle potentiel dans l'initiation et la régulation de la réponse neuroinflammatoire n'a été découverte que récemment. En effet, plusieurs équipes indépendantes ont montré que les neurones participent non seulement activement à la réponse neuroinflammatoire, mais que les

neurones peuvent également synthétiser et libérer des molécules inflammatoires (Brambilla et al., 2005) (Massa et al., 2006). Une communication réciproque entre neurones et cellules microgliales lors du déclenchement ou de l'inhibition des réponses inflammatoires semble maintenant bien établie (Figure 15) (Carson et al., 2006), mais les mécanismes précis impliqués restent à être caractérisés plus en détail.

Les neurones, par des contacts directs (Sema-7A, CD95L, CD22, CD200, CD47, NCAM, ICAM-5) et par la libération de molécules solubles (CXCL31, BDNF, TGF- $\beta$ , IL10, NGF, Dopamine, GABA...) freinent l'inflammation en contribuant à maintenir les cellules microgliales dans un état quiescent (Figure 15) (Chavarría et Cárdenas, 2013). Ces molécules sont présentes en conditions physiologiques et créent un environnement immunosuppresseur pouvant expliquer ces fameux privilèges immunitaires du système nerveux central (Suzumura, 2013) (Cserép, Pósfai et Dénes, 2021).



*Figure 15 : Les neurones maintiennent les cellules microgliales dans un état quiescent grâce à des contacts directs ou des molécules solubles libérées par les neurones. Figure adaptée de Chavarría et Cárdenas, 2013.*

### III.1.2.3 Les oligodendrocytes

Les oligodendrocytes forment la gaine de myéline entourant les axones. Cette dernière permet principalement d'accélérer la vitesse de conduction de l'information nerveuse le long des axones (Kuhn et al., 2019). Longtemps considéré comme des cellules « sans défense » lors d'épisodes neuroinflammatoires, ces cellules disposent en fait de tout l'équipement moléculaire nécessaire à la modulation de la réponse inflammatoire (Zeis, Enz et Schaeren-Wiemers 2016).

### III.1.2.4 Les cellules périvasculaires

Les cellules périvasculaires, à l'inverse des cellules gliales et des neurones, qui se trouvent exclusivement dans le SNC, sont positionnées sous la lame basale des vaisseaux sanguins et font donc partie de la BHE. Péricytes et macrophages périvasculaires sont donc à l'interface entre le SNC et de la périphérie. Un dysfonctionnement de ces cellules altère l'étanchéité de la barrière hématoencéphalique (Galea, 2021). Elles participent activement à la protection du SNC, particulièrement en cas d'infections fongiques, bactériennes et virales (Galea, 2021). Cependant, il n'est pas encore clairement établi si, ces cellules sont en mesure de présenter des antigènes. Elles jouent également un rôle dans le recrutement des macrophages périphériques lors d'épisodes neuroinflammatoires particulièrement intenses (Rustenhoven et al., 2017).

### III.1.2.5 Les macrophages périphériques

Lors d'épisodes inflammatoires du SNC particulièrement intenses, comme par exemple dans les stades tardifs des maladies neurodégénératives ou de douleurs neuropathiques, les monocytes périphériques peuvent s'infiltrer dans le parenchyme cérébral et se différencier localement (*in situ*) en macrophages. Le rôle précis de ces macrophages «infiltrants», par rapport aux cellules microgliales résidentes actives, reste encore largement incompris, principalement car il est impossible de les différencier sur la base des critères morphologiques et phénotypiques couramment utilisés (Grassivaro et al., 2019).

## III.1.3 Médiateurs moléculaires de la neuroinflammation

Lors de phénomènes neuroinflammatoires, toutes les cellules gliales présentes dans le système nerveux central vont donc être capables de s'adapter à la suite d'une activation. Cette adaptation s'accompagne de changements moléculaires aussi bien dans les molécules sécrétées, que dans l'expression ou la modification post-transcriptionnelle de protéines. Bien que chaque type

cellulaire va participer activement à la rémission ou à la propagation de la neuroinflammation, les cellules microgliales, restent les cellules pour lesquelles l'adaptation phénotypique reste la plus importante.

#### III.1.3.1 Marqueurs d'activation microgliale

Les cellules microgliales sont les premières à répondre en cas de dérégulation de l'homéostasie cérébrale. Bien que cela soit dû à leur morphologie quiescente leur permettant de sonder leur environnement de manière extrêmement efficace, cela se traduit également au niveau moléculaire avec l'expression d'une diversité de facteurs permettant d'identifier et de faire face aux menaces. Parmi ces facteurs on retrouve, les *toll-like receptors* (TLR), les *NOD-like receptors* (NLR), les complexes majeurs d'immunocompatibilité (CMH). La stimulation de ces derniers s'accompagne de l'activation de voies de signalisations intracellulaires spécifiques nécessaires à la synthèse et la libération de facteurs inflammatoires ainsi qu'à l'initiation de la phagocytose (Boche, Perry et Nicoll, 2013).

#### III.1.3.2 Présentation d'antigènes

Les cellules microgliales sont des cellules présentatrices d'antigènes. Après activation, grâce aux molécules du CMH (type 2), elles présentent des fragments d'agents pathogènes après phagocytose et digestion. Cela permet d'activer les cellules microgliales voisines et de propager la neuroinflammation (Ransohoff et Engelhardt, 2012).

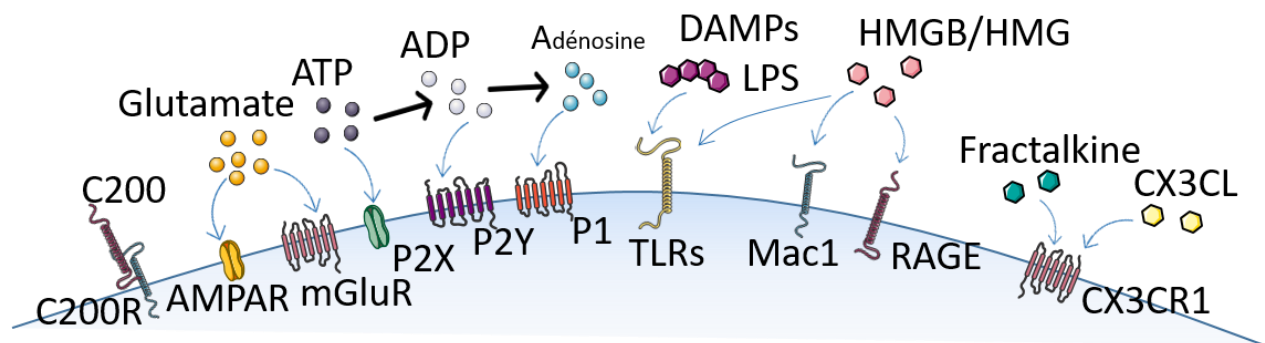
L'expression d'autres protéines membranaires, responsables de la présentation d'antigène augmente également. CD40, par exemple, peut induire l'activation de la kinase ERK1/2 et la sécrétion de facteurs immuns comme par exemple CXCL8, impliqué dans l'attraction des cellules immunitaires au site d'inflammation. Bien évidemment, les CMH ne lient que l'antigène. Pour une activation complète de la cellule microgliale d'autres signaux sont également nécessaires. Ces signaux proviennent par exemple de CD80 et CD86, CD28 ou ICAM-1 qui sont en synergie avec l'activation du CMH (type 2) (Lebedeva, Dustin et Sykulev, 2005).

#### III.1.3.3 Protéines membranaires et transmembranaires

Les protéines exprimées à la surface externe de la membrane plasmique des microglies font partie des premières à interagir avec des agents pathogènes ou des molécules proinflammatoires (Figure 16). L'intégrine alpha M, aussi appelée CD11b, est sûrement la plus connue d'entre elles.

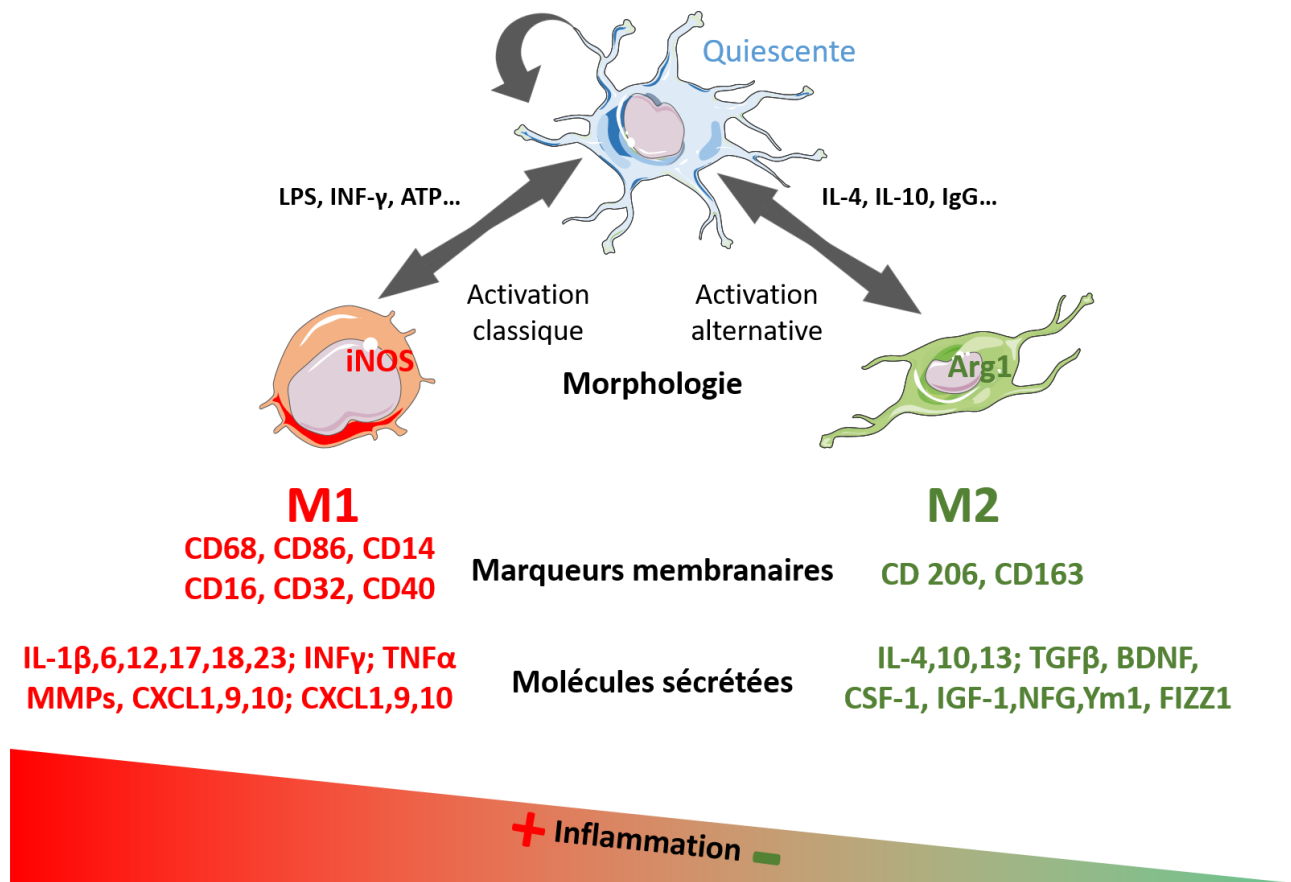


Elle est utilisée comme marqueur permettant d'identifier et d'isoler les cellules microgliales lors de cultures primaires. CD11b s'assemble avec l'intégrine  $\beta 2$ , appelée aussi CD18, pour former l'antigène des macrophages 1 (MAC-1 ou CR3) (Figure 16). Ce complexe moléculaire est, entre autres, connu pour ses rôles dans l'adhésion cellulaire ainsi que dans la phagocytose de molécules associées au complément (Rotshenker, 2003). Comme son nom l'indique, il n'est cependant pas spécifique des cellules microgliales ; en effet il est également exprimé par les macrophages périphériques (Lamers , Plüss et Ricklin, 2021). Ce dernier point remet en question l'utilisation de MAC-1 comme marqueur microglial lors d'études de pathologies accompagnées d'une invasion du système nerveux central par des macrophages périphériques.



*Figure 16 : Différentes protéines exprimées à la membrane plasmique microgliale, ainsi que leurs ligands, pouvant être impliqués dans l'activation cellulaire.*

D'autres protéines membranaires sont également exprimées par la microglie activée : CD14, CD16, CD45, CD68, CD115, CX3CR1 et F4/80. Ces derniers, rendent ces cellules capables de réagir de façon très spécifique aux différents stimuli immunitaires et d'adapter leur réponse en cas de neuroinflammation. CD14 est un corécepteur de TLR-4 à la membrane plasmique et de TLR-7/9 à la surface des endosomes. Il intervient dans la présentation d'antigène ([Ciesielska, Matyjek et Kwiatkowska, 2021](#)). CD16, quant à lui, reconnaît des IgG et initie la phagocytose ([Nagarajan et al., 1995](#)). CD45 engendre la prolifération et la différenciation des microglies. CD68 est une glycoprotéine transmembranaire localisée à la membrane plasmique, aux endosomes et lysosomes des cellules microgliales. Elle est surexprimée après activation des cellules immunitaires et joue un rôle dans l'endocytose et le trafic lysosomal : c'est ainsi le principal marqueur utilisé pour identifier les cellules microglies activées. Cette protéine est internalisée immédiatement après stimulation pour stimuler ses voies de signalisation intracellulaire ([Lier Streit et Bechmann, 2021](#)). CD115, appelé aussi CSF1R (Récepteur au Facteur Stimulant les Colonies 1), est un récepteur tyrosine kinase. Il se lie à des molécules proinflammatoires comme le CSF1 ou l'IL-34, impliquées dans la prolifération et la différenciation microgliale ([Cronk et Kipnis 2013](#)). Ce récepteur est également impliqué dans la réorganisation du squelette d'actine cortical, phénomène à l'origine des changements morphologiques des cellules microgliales. Le récepteur transmembranaire couplé aux protéines G, CX3CL1R, est capable de lier la fractalkine et engendre la migration et l'adhésion des microglies ([Arnoux et Audinat 2015](#)). Finalement, la glycoprotéine F4/80 (EMR1), impliquée dans l'adhésion cellulaire, est également un des marqueurs couramment utilisé pour identifier la microglie murine ([Lawson et al., 1990](#)).



*Figure 17 : Protéines membranaires et solubles en fonction de l'état d'activation de la microglie. Lors d'un phénotype M1, obtenu après activation classique, la microglie surexprime des récepteurs membranaires et sécrète des molécules solubles proinflammatoires. L'activation alternative augmente l'expression de marqueurs membranaires et solubles anti-inflammatoires (état M2).*

Comme évoqué précédemment, ces molécules servent souvent de marqueurs d'activation microgliaux dans les études de pathologies accompagnées d'épisodes neuroinflammatoires car elles sont surexprimées dans ces situations (Figure 17). Cependant, étant donné que ces marqueurs sont également exprimés par les macrophages infiltrants du SNC, une attention particulière doit donc être portée à l'interprétation des résultats d'études *in vivo* utilisant ces

marqueurs. De plus, étant donné que les cultures primaires de microglies sont rarement pures, les études *in vitro* réalisées avec ce type de modèle doivent également être considérées avec plus de recul. D'un autre côté, l'utilisation de lignées cellulaires issues de cellules microgliales immortalisées du système nerveux, comme les cellules BV2, n'entraîne pas ces biais (absence de contamination avec d'autres types cellulaires, milieu de culture très contrôlé, protocoles standardisés...) et représente donc une alternative cohérente pour étudier diverses protéines exprimées par les microglies.

#### III.1.3.4 Protéine intracellulaires et effectrices

L'activation des récepteurs membranaires microgliaux et leurs interactions avec d'autres protéines engendrent des cascades intracellulaires entraînant les adaptations cellulaires nécessaires afin de répondre de manière adéquate au stimulus en question.

IBA-1, appelée aussi facteur de réponse microglial, est le marqueur d'activation microgliale le plus utilisé. Cette protéine intracellulaire, capable de complexer le calcium intracellulaire, est très étudiée car sa séquence en acides aminés est très conservée d'une espèce à l'autre. Elle est impliquée dans la réorganisation du cytosquelette microglial, en influençant l'actine, et la phagocytose (Sasaki et al., 2001). Son expression est augmentée en cas d'activation microgliale.

Les protéines du cytosquelette comme la vimentine ou l'actine sont également utilisées pour apprécier l'activation cellulaire. La vimentine est une protéine, constituant les filaments intermédiaires des microglies, qui est clivée durant un épisode inflammatoire. Les fragments de vimentine qui en résultent, engendrent l'adressage nucléaire de MAP kinases (Ridge et al., 2022). Le cytosquelette d'actine peut être également modifié lors d'une activation. La rétraction des processus cytoplasmiques, l'initiation de la migration ou la phagocytose engendrent une réorganisation du réseau d'actine sous membranaire (Abd-El-Basset et Fedoroff, 1995). Cette réorganisation du cytosquelette lors de l'activation est également mise en évidence par l'importance de la myosine dans ce processus. Cette dernière est impliquée dans la formation et le maintien du cytosquelette d'actine. Lorsqu'elle est dysfonctionnelle ou absente, l'activation

induite par le LPS est altérée. Ce phénomène se traduit par des défauts de migration cellulaire et de phagocytose (Okazaki et al., 2020).

#### III.1.3.5 Molécules solubles

Sûrement les plus étudiées et les plus connues, les cytokines sont les principales molécules effectrices sécrétées par la microglie. Ces polypeptides solubles, de faible poids moléculaire, sont libérées par les cellules activées lors d'épisodes inflammatoires (Hanisch, 2002). On retrouve parmi elles : les interleukines (IL), les interférons (INF), les facteurs de croissance et les chimiokines (Figure 17). Ces molécules ont une activité biologique à faible concentration et ciblent de multiples types cellulaires à distance grâce aux nombreux récepteurs membranaires de haute affinité qu'elles expriment. Ces cytokines vont avoir des effets divergents, certaines vont promouvoir l'inflammation et d'autres vont l'inhiber (Hanisch, 2002).

D'autres molécules solubles, comme l'ATP et ses métabolites (Burnstock, 2008), certains neurotransmetteurs (glutamate, GABA) (Pocock et Kettenmann, 2007) ou encore des modifications de concentrations ioniques extracellulaires induisent et propagent également l'inflammation. Par exemple une augmentation du potassium extracellulaire (20mM au lieu de 5mM) va exacerber la neurotoxicité induite par le LPS (Chang et al., 2000).

La matrice extracellulaire a également un rôle à jouer dans la diffusion des divers facteurs sécrétés par la microglie et sa migration vers les sites de lésion. En fonction de sa densité et des types de molécules la constituant elle peut offrir des conditions favorables ou défavorables à la propagation de la neuroinflammation (Nissinen et Kähäri, 2014). Les cellules microgliales possèdent donc l'équipement protéique nécessaire pour influencer cette matrice. Elles peuvent, par exemple, sécréter des «matrix métalloprotéinases (MMP)» capables de dégrader la matrice extracellulaire (Nissinen et Kähäri, 2014) et ainsi permettre une meilleure biodisponibilité des cytokines.

Comme nous l'avons vu précédemment, selon les stimuli, leurs intensités, leurs durées et l'état initial des cellules microgliales (entraînées ou tolérantes, grâce aux phénomènes de *priming*) l'activation engendre un phénotype considéré comme neurotoxique, proinflammatoire, appelé

couramment M1 et un phénotype neuroprotecteur, anti-inflammatoire, appelé M2. Même si de nos jours, une classification stricte M1/M2 est remise en question ([Ransohoff, 2016](#)), ils sont associés à des marqueurs spécifiques permettant d'identifier l'état d'activation des microglies (Figure 17).

#### III.1.3.6 Phénotype pro inflammatoire (M1)

L'induction d'un phénotype pro inflammatoire M1 peut être obtenu en incubant les cellules avec du LPS ([Shabab et al., 2017](#)) ([Ye et al., 2020](#)). Cela engendre une production, une expression et/ou une sécrétion de molécules proinflammatoires. Par exemple, l'enzyme iNOS, produisant du monoxyde d'azote, un dérivé réactif de l'oxygène toxique pour les cellules, est surexprimée en condition proinflammatoire ([Possel et al., 2000](#)). Parmi les protéines surexprimées durant l'état M1 on retrouve également des protéines membranaires. La plupart de ces protéines sont exprimées de façon constitutive par les cellules microgliales quiescentes, en revanche leurs niveaux d'expression peuvent augmenter ou diminuer drastiquement après activation ([Jurga, Paleczna et Kuter, 2020](#)) (Figure 17) :

- CD16 et CD32, qui sont des récepteurs membranaires, vont être activés par le fragment Fc des immunoglobulines et induire la production de facteurs pro inflammatoires.
- CD68 est également surexprimé en condition pro inflammatoire.
- CD86 et CD40 tous deux impliqués dans la prolifération et la sécrétion de molécules pro inflammatoires vont également être surexprimés dans l'état M1.

L'activation de ces protéines induit la production et la sécrétion de molécules immunes qui peuvent également servir de marqueur de l'état M1. Les cytokines proinflammatoires telles que l'IL-1  $\beta$ , IL-6, IL-12, IL-17, IL-18, le TNF  $\alpha$  ou encore l'interféron  $\gamma$  sont produites et libérées abondamment durant l'activation microgliale M1 (Figure 17). Ces molécules maintiennent l'environnement cellulaire dans un état proinflammatoire. En stimulant les microglies environnantes de façon paracrine ou autocrine, ces molécules vont induire une activation microgliale proinflammatoire plus étendue et intense. Par exemple des microglies quiescentes incubées avec de l'interféron  $\gamma$  ou du TNF  $\alpha$  vont à leur tour changer de phénotypes et s'activer ([Jurga, Paleczna et Kuter, 2020](#)).

Finalement, les microglies au stade d'activation M1 sécrètent abondamment certains facteurs chimiotaxiques : les chimiokines (CCL5, CCL20, CXCL1, CXCL9, CXCL10...). Ces derniers permettant alors de recruter des cellules immunitaires (résidentes ou infiltrantes du système nerveux central) au site d'inflammation (Jurga, Paleczna et Kuter, 2020).

#### III.1.3.7 Phénotype anti inflammatoire (M2)

L'induction d'un phénotype anti-inflammatoire M2, obtenu par exemple après incubation avec de l'IL-4 est quant à lui neuroprotecteur et restaure l'homéostasie du système nerveux (Jurga, Paleczna et Kuter, 2020). A l'inverse de l'activation classique, la polarisation vers un état M2 va favoriser la réparation et la protection de la matrice extracellulaire, tout en phagocytant les débris.

La protéine CD206, appelée aussi récepteur aux mannoses, exprimée à la membrane plasmique et sur les endosomes, responsable de phagocytose, est surexprimée dans l'état M2 (Figure 17) (Jurga, Paleczna et Kuter, 2020). Il est impliqué dans l'élimination par phagocytose de glycoprotéines et de longues chaînes polysaccharidiques pathogènes. C'est le marqueur le plus utilisé pour identifier une activation de type M2. D'autres récepteurs membranaires comme CD163, responsable de l'élimination d'hémoglobine oxydée vont également être surexprimés (Jurga, Paleczna et Kuter, 2020).

L'état M2 est également caractérisé par la hausse de production et de sécrétion de cytokines anti-inflammatoires (IL-4, IL-10, IL-13 ou encore TGF  $\beta$ ) (Figure 17). Ces derniers peuvent servir de marqueur de l'état M2 (Jurga, Paleczna et Kuter, 2020). De plus, dans le milieu extracellulaire elles induisent la synthèse d'YM1, de FIZZ1 et d'arginase 1 (Arg1). Arg1 est une enzyme qui va convertir l'arginine en ornithine et en urée, puis en proline et polyamine nécessaires à la rémission de l'inflammation.

Même si chaque état, M1 ou M2, dispose de marqueurs bien définis, comme une surexpression de CD68 ou CD86 pour l'état M1 et une surexpression de CD206 pour l'état M2, de nos jours, l'état activé des cellules immunitaires (centrales et périphériques) suit un spectre d'activation plus subtil et la limite entre M1 et M2 ainsi que l'apport de chaque état est situation dépendante.

De plus, afin de conclure de façon rigoureuse sur un état d'activation induit dans les microglies, il est préférable d'associer des mesures de plusieurs marqueurs évoqués précédemment en parallèle et d'y associer d'autres méthodes d'évaluations comme des dosages de cytokines ou une analyse morphologique (CD68 vs CD206 + sécrétion de cytokines + analyse du cytosquelette, de la morphologie cellulaire par exemple).

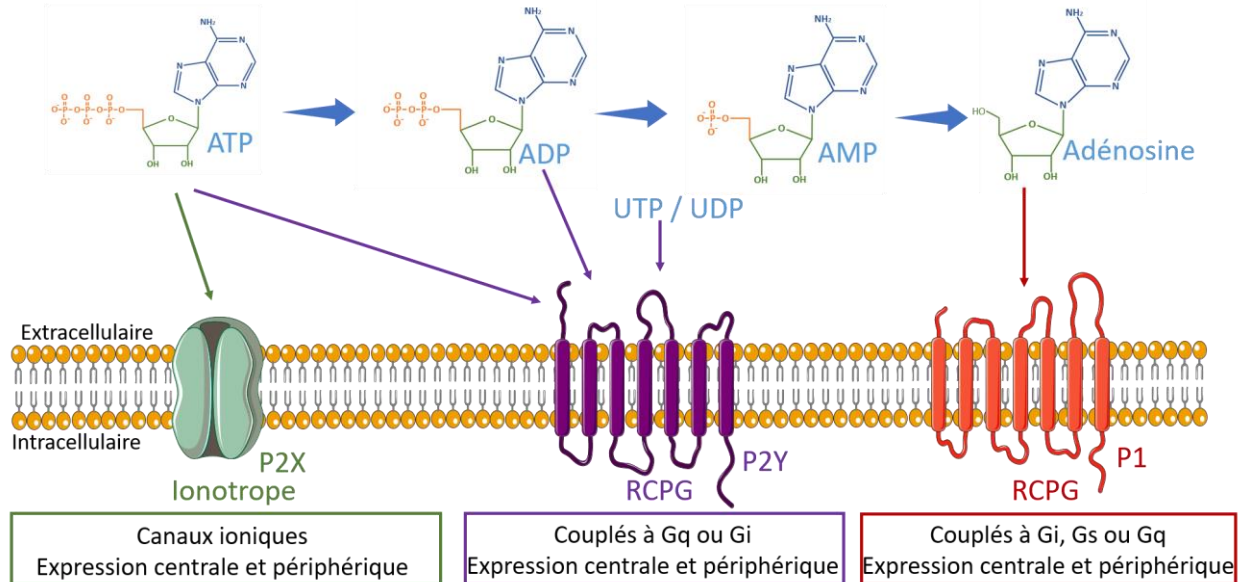
Dans le même esprit, d'autres molécules, dont la fonction primaire n'est pas la régulation de l'activité microgiale peuvent également impacter de manière très subtile l'état d'activation des cellules ainsi que leur devenir. L'ATP en est l'exemple parfait ([Burnstock, 2008](#)). Sa concentration extracellulaire est très faible en condition physiologique, mais elle peut augmenter drastiquement et localement lors de lyses cellulaires ou d'inflammation intense. Dans le milieu extracellulaire, l'ATP va rapidement être dégradée en ADP, AMP et adénosine. L'ATP et l'ADP vont agir sur des récepteurs canaux (P2X) ou métabotropes (P2Y) exprimés par la microglie pour induire des réponses extrêmement variées ; car dépendant de la nature chimique, de la concentration, de la durée d'exposition mais aussi du cyclage des récepteurs en question au niveau du système endolysosomal des microglies ([Burnstock, 2008](#)).



### III.2 Système purinergique

L'adénosine-5'-triphosphate (ATP) est principalement connue comme le substrat énergétique majoritaire des cellules de l'organisme. Elle a été décrite pour la première fois en 1929 par le chimiste allemand Karl Lohmann (Langen et Hucho, 2008). Utilisée par les bactéries, les mycètes, les plantes et les animaux, cette molécule est universelle dans le monde vivant (Langen et Hucho, 2008). L'ATP est synthétisée dans les cellules de mammifères, grâce à la chaîne respiratoire mitochondriale et dans les chloroplastes lors de la photosynthèse chez les végétaux. Dès 1959, P. Holton montre que l'ATP peut être libérée suite à la stimulation du nerf auriculaire de lapin, suggérant que l'ATP pourrait jouer un rôle de messager extracellulaire (Holton, 1959). En 1972, Burnstock s'intéresse à la transmission non cholinergique, non adrénergique dans le système nerveux autonome périphérique et décrit des réponses nerveuses à la suite d'applications d'ATP (Burnstock, 2012). Burnstock suggère alors un rôle de neurotransmetteur pour l'ATP. Cette hypothèse est validée par plusieurs équipes qui vont démontrer une colibération entre les neurotransmetteurs classiques, excitateurs et inhibiteurs, Glutamate et GABA, ainsi que de l'ATP (Edwards, Gibb et Colquhoun, 1992) (Mori et al., 2001) (Jo et Schlichter, 1999).

L'ATP et ces métabolites vont agir sur différents récepteurs qui ont été caractérisés par Burnstock en 1978 (Burnstock, 2012). Historiquement, deux familles de récepteurs ont été proposées, les récepteurs de l'adénosine, nommés récepteur P1 (renommé récepteur A selon la nouvelle nomenclature) et les récepteurs de l'ATP, nommés récepteur P2. Par la suite la famille P2 a été subdivisée en P2X pour les récepteurs-canaux et P2Y pour les récepteurs métabotropes (Figure 18) (Burnstock, 2012).



**Figure 18** : Les différents récepteurs des purines. Les récepteurs P2Xs sont des récepteurs-canaux, activés par l'ATP extracellulaire, les récepteurs P2Y sont des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) (Gq ou Gi). Ils sont, selon leur type, activés par l'ATP, l'ADP, l'UTP ou l'UDP glycosylée (ou non) extracellulaires. Enfin, les récepteurs P1, activés par l'adénosine extracellulaire, sont des RCPGs, couplés à Gi, Gq ou Gs. Les trois familles de récepteurs sont exprimées dans le système nerveux central et en périphérie.

### III.2.1 Les récepteurs de l'adénosine

Les récepteurs de l'adénosine (historiquement appelés récepteurs P1), activés par l'adénosine extracellulaire, font partie de la famille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPGs) (Figure 19). Quatre membres ont été décrits jusqu'à présent, A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub> et A<sub>3</sub> (Burnstock, 2018). Les récepteurs A<sub>1</sub> et A<sub>3</sub>, couplés à une protéine G<sub>i</sub>, inhibent l'adénylate cyclase et par conséquent la synthèse d'AMP cyclique. Les récepteurs A<sub>2A</sub> et A<sub>2B</sub>, sont couplés à G<sub>s</sub>, ils stimulent la synthèse d'AMP cyclique. Même si l'expression de ces récepteurs est ubiquitaire, on retrouve préférentiellement les récepteurs A<sub>1</sub> et A<sub>2A</sub> dans le système nerveux central. Exprimés par les cellules gliales et les neurones, ces récepteurs vont être localisés à proximité des synapses des

neurones glutamatergiques, cholinergiques, dopaminergiques, sérotoninergiques, noradrénergiques et GABAergiques, aussi bien sur l'élément pré- que post-synaptique. Leur activation permet de moduler la neurotransmission et la communication neurogliale (Burnstock, 2018).

Ces récepteurs peuvent former des hétéromères, entre eux, mais également avec d'autres récepteurs, comme les récepteurs de la dopamine. A<sub>1</sub> dimérise avec le récepteur dopaminergique D1 et A<sub>2A</sub> avec le récepteur dopaminergique D2 (Fuxe et al. 2007).

Impliqués dans des pathologies telles que les maladies neurodégénératives, les maladies génétiques et les affections psychologiques comme l'anxiété et la dépression, ces récepteurs sont également étudiés afin de trouver de nouvelles pistes thérapeutiques pour traiter ces troubles neurologiques (Borea et al., 2018)(Ballesteros-Yáñez et al., 2018).

### III.2.2 Les récepteurs métabotropes P2Y

Les récepteurs métabotropes P2Ys sont exprimés par les neurones et les cellules gliales dans le système nerveux central. Il en existe huit membres distincts, qui peuvent être couplés à une protéine G<sub>i</sub> (P2Y<sub>12</sub>, P2Y<sub>13</sub>, P2Y<sub>14</sub>), une protéine G<sub>q</sub> (P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub>, P2Y<sub>6</sub>) ou les deux pour le P2Y<sub>11</sub> (von Kügelgen et Hoffmann 2016). Un couplage à G<sub>i</sub>, conduit à la diminution des concentrations cytosoliques d'AMP cyclique, suite à l'inhibition de l'adénylate cyclase et modifie l'activité de plusieurs types de canaux ioniques exprimés à la membrane plasmique (canaux Ca<sup>2+</sup> et K<sup>+</sup> voltage-dépendants). Un couplage à G<sub>q</sub> active la phospholipase C (PLC) et entraîne une augmentation de la concentration d'IP<sub>3</sub> qui va induire la libération de calcium à partir de réservoirs de calcium intracellulaire (réticulum endoplasmique, lysosomes) pour augmenter la concentration de calcium libre intracellulaire ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) (Fischer et Krügel, 2007).

Jusqu'à présent les récepteurs P2Y ont été identifiés sous forme de monomères à la membrane plasmique. Cependant des données récentes suggèrent que ces récepteurs sont capables de former des homodimères, comme c'est par exemple le cas pour le récepteur P2Y<sub>2</sub> (Abe et al., 2018).

Les récepteurs P2Y remplissent des fonctions physiologiques comme la modulation de la libération de neurotransmetteur et sa recapture. Mais également la protection neuronale grâce à l'expression microgliale du récepteur P2Y<sub>12</sub>, qui, présent sur les prolongements cytoplasmiques interagit avec le soma des neurones pour moduler leurs excitabilités (Audinat et Arnoux, 2014) (Lin et al., 2021). De même, l'expression très précoce des récepteurs P2Y durant le développement cérébral suggère des rôles développementaux. P2Y<sub>12</sub>, par exemple, est impliqué dans la synaptogénèse (Lin et al., 2021) (Cserép et al., 2022). Si ce récepteur est dysfonctionnel, cela engendre des troubles neurodéveloppementaux, pathologies cognitives (trouble du spectre de l'autisme, dépression...), neurodégénératives, de la neuroinflammation chronique ou encore des douleurs neuropathiques (Burnstock, 2017).

### III.2.3 Les récepteurs-canaux P2X

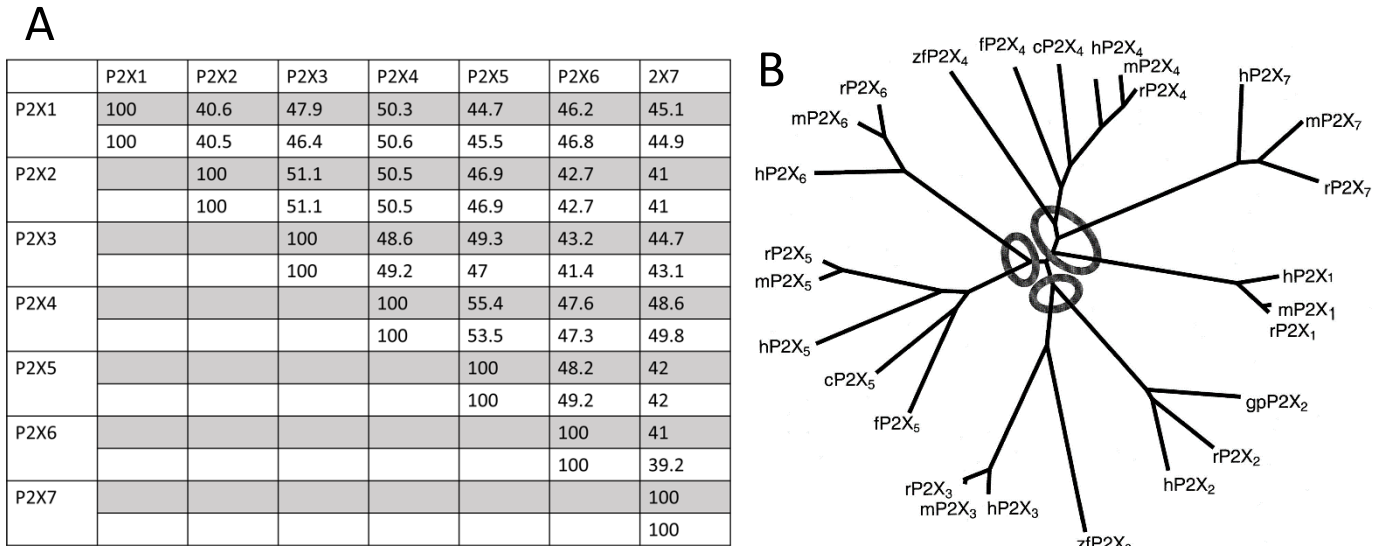
Cette dernière sous-famille des récepteurs à l'ATP est la seule ne faisant pas partie de la famille des RCPGs. En effet, ces derniers sont des récepteurs canaux, qui après liaison de l'ATP extracellulaire, engendrent une entrée non sélective de cations (Ca<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup>) et une sortie de K<sup>+</sup>. Ces récepteurs sont exprimés dans l'ensemble de l'organisme (Burnstock, 2018).

#### III.2.3.1 Structure des récepteurs P2X

Cette sous famille est composée de 7 membres (P2X 1 à 7) qui peuvent s'assembler en homo-ou hétérotrimères afin de former des récepteurs fonctionnels, à l'exception du P2X7 qui n'existe que dans sa forme homotrimérique. Le premier récepteur P2X à avoir été cloné est le récepteur P2X1 en 1994 par Valera et al. (Valera et al., 1994) suivi du P2X2, la même année, par Brake et al., (Brake, Wagenbach et Julius, 1994). Le récepteur P2X7 comporte des particularités qu'aucun autre récepteur P2X ne partage. Historiquement, il a donc été d'abord désigné sous le nom de récepteur P2Z et classé un peu à part (Surprenant et al., 1996).

Chaque sous-unité est codée par un gène spécifique. Cependant pour certaines, par exemple P2X4 et P2X7, les gènes sont adjacents ce qui suggère une duplication génique au cours de l'évolution (Figure 19B) (North, 2002).

Les différents récepteurs P2X ont une topologie commune et présentent 40 à 50% d'homologie chez le rat (Figure 19A). Leurs extrémités C et N terminales sont intracellulaires. Elles sont composées d'une large boucle extracellulaire qui peut être sujette à des modifications tertiaires (ponts disulfures, glycosylations...), de deux segments transmembranaires nommés TM1 et TM2, et d'un domaine intracellulaire dont la longueur varie d'une sous-unité à l'autre (Burnstock, 2018).

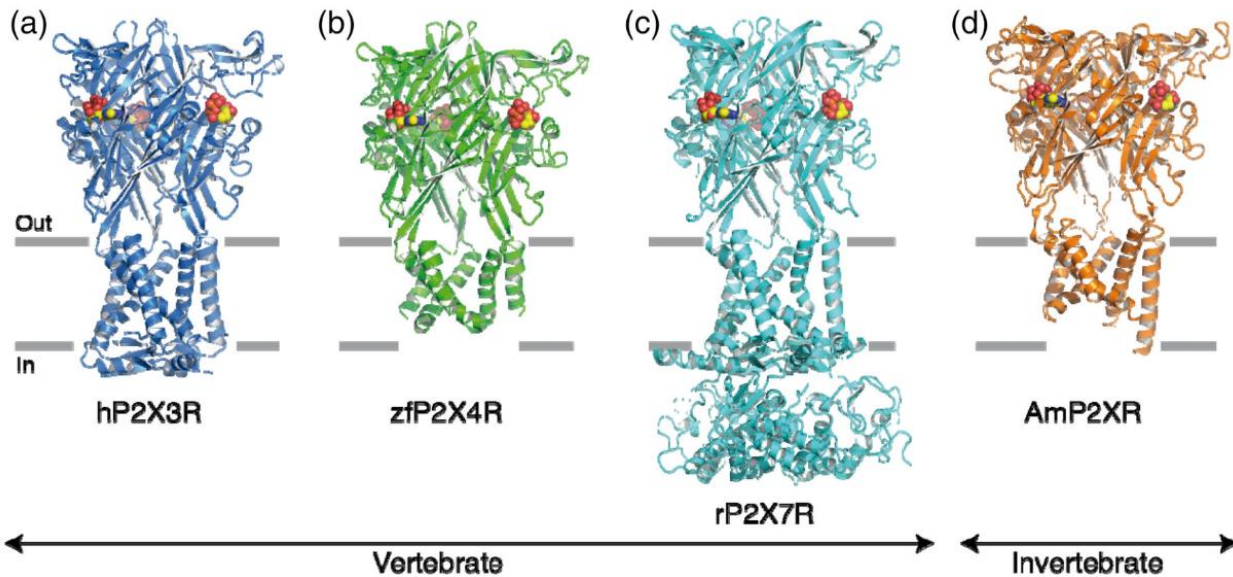


**Figure 19** : Homologie des différents sous unités P2X. **A**. Pourcentage d'homologie entre chaque sous unité P2X (1-7). Les cases en gris représentent le pourcentage d'homologie entre les segments transmembranaires (TM) et ceux en blancs de la boucle extracellulaire. **B**. Dendrogramme des différentes sous unités P2X (1-7) (Noth, 2002).

Pour qu'un récepteur P2X soit fonctionnel il doit être sous forme trimérique, avec la poche de liaison de l'ATP qui se situe sur à l'interface des domaines extracellulaires de deux sous-unités adjacentes (North, 2002). Les structures 3D qui ont permis de confirmer la localisation précise de ce site. La première structure à avoir été caractérisé est celle du P2X4 de poisson zèbre dans son état fermé, en 2009 (Kawate et al., 2009), puis en présence d'ATP en 2012 (Hattori et Gouaux, 2012). S'en suit celle du P2X3 humain en 2016 (Mansoor et al., 2016) et finalement en 2019 avec la première structure complète en cryo-EM du récepteur P2X7 (McCarthy, Yoshioka et Mansoor, 2019).

Au cours de ces dernières années, les structures à haute résolution de 29 trimères de récepteurs P2X ont été déterminées dans différentes espèces. Le récepteur P2X7 semble unique, car sa

région C terminale est extrêmement longue par rapport aux autres récepteurs P2Xs. Les similarités structurales, tertiaires et quaternaires, entre ces différents récepteurs valident l'hypothèse selon laquelle les différentes sous-unités appartiennent à un même groupe et dérivent probablement d'un gène ancestral commun (North, 2002).



**Figure 20** : Structures de différents récepteurs P2Xs, provenant de différentes espèces. (a) P2X3 humain, (b) P2X4 de zebrafish, (c) P2X7 de rat, (d) récepteur P2X chez les invertébrés. Les molécules d'ATP sont représentées en rouge et se fixent sur la partie extracellulaire du récepteur. (Illes et al. 2021)

L'analyse structurale révèle que dans sa forme trimérique, après assemblage de trois monomères, la partie extracellulaire des récepteurs P2X adopte une forme de calice haut d'environ 70 Å. La partie transmembranaire est composée de six hélices  $\alpha$  (deux par sous unité monomérique), et s'étend d'environ 28 Å dans la membrane plasmique (Illes et al., 2021). La partie intracellulaire, moins longue que la région extracellulaire, contient le cap cytoplasmique, une région riche en feuillets  $\beta$ . La partie intracellulaire du récepteur P2X7 contient également deux domaines complémentaires décrits par McCarthy et al., en 2019. Une des régions de la partie intracellulaire de P2X7 dénommée « ancre C-cys » est située à proximité de la membrane plasmique. Elle est riche en cystéines et en résidus palmitoylés. L'autre région, est constituée par un large domaine intracellulaire appelé le ballaste cytoplasmique. Ces deux structures se trouvent dans la partie C terminale de la protéine P2X7 (Figure 20) (McCarthy, Yoshioka et Mansoor, 2019).

### III.2.3.2 Sites de liaison des agonistes

L'ATP, agoniste naturel des récepteurs P2X, est capable de se fixer sur trois poches de liaisons situées sur la partie extracellulaire du récepteur trimérique (Figure 20). Ces sites, localisés à 40 Å des segments transmembranaires, sont localisés à l'interface des différentes sous unités monomériques. Les phosphates, chargés négativement, de l'ATP se lient aux acides aminés basiques (lysines et arginines) qui constituent ces régions, grâce à des liaisons ioniques. L'adénosine de l'ATP, se lie ensuite à des régions plus profondes des pochettes de liaison grâce à des interactions ioniques et hydrophobes (leucine et isoleucine). Finalement, le ribose de l'ATP interagit avec des résidus non polaires (leucine). Tous ces acides aminés responsables de la liaison de l'ATP sont très conservés d'un récepteur P2X à l'autre, et d'une espèce à l'autre, suggérant une importance capitale dans le fonctionnement du vivant dans son ensemble.

Les autres agonistes des récepteurs P2X sont également capables de se lier de la même façon dans ces poches de liaison, avec quelques subtilités dépendant notamment de la base de l'agoniste.

L'accès au site de liaison de l'ATP pour le récepteur P2X7 est plus encombré que celui couramment observé pour les autres récepteurs P2X. En effet McCarthy et. al (2019) montrent qu'elle a une taille de 11 Å (contre 17 Å pour les autres récepteurs P2X). Cette différence d'accessibilité explique potentiellement la faible affinité du récepteur P2X7 pour l'ATP (McCarthy, Yoshioka et Mansoor, 2019).

### III.2.3.3 Sites de liaison des antagonistes

Cette pochette de liaison d'ATP dans les récepteurs P2Xs permet également de lier des antagonistes orthostériques (compétitifs), comme le TNP-ATP ou l'A-317491, un antagoniste P2X3, P2X2/3. Les études structurales du récepteur, après liaison de ces antagonistes, montrent qu'ils interagissent différemment avec le site de liaison. Leurs inflexibilités conformationnelles pourraient expliquer une absence d'ouverture du canal malgré une occupation des sites de liaison.

### III.2.3.4 Sites allostériques

De nombreux autres inhibiteurs des récepteurs P2Xs sont capables de se lier à des sites allostériques, éloignés des poches de liaison à l'ATP. L'étude structurale après liaison d'inhibiteurs

non compétitifs a révélé la présence de plusieurs sites allostériques. Par exemple, Karasawa et Kawate, ont montré en 2016 l'existence d'un site, situé au-dessus du site de liaison orthostérique du récepteur P2X7 de Panda après avoir supprimé la partie C terminale du récepteur. Ce site n'est pas présent sur le récepteur P2X4 (Karasawa et Kawate 2016). Un autre site allostérique se trouve juste en dessous du site de liaison de l'ATP. Celui-là, a été mis en évidence par Wang et al., en 2018 dans le récepteur P2X3 humain (Wang et al. 2018). Une fois que l'antagoniste s'est fixé sur son site allostérique, le changement de conformation du canal, nécessaire à son ouverture ne peut plus se faire ou se fait plus difficilement (Karasawa et Kawate 2016) (Wang et al. 2018) (Li et al., 2019). D'autres sites allostériques ont également été décrits pour les récepteurs P2Xs, notamment près des segments transmembranaires pour le récepteur P2X7 (Karasawa et al., 2017).

#### III.2.3.5 Activation, désactivation et désensibilisation des récepteurs P2X

Les récepteurs P2Xs partagent le même fonctionnement de base. Après fixation de l'agoniste sur le récepteur, un changement de conformation très rapide s'opère et le récepteur passe d'un état fermé à un état ouvert. Lors de la dissociation du ligand pendant l'ouverture (désactivation), le canal bascule dans son état initial activable. Cependant, lorsqu'il est présent en forte concentrations, l'agoniste peut rester présent sur son site de liaison. Cela provoque alors une réorganisation structurale de la protéine plus importante et engendre sa désensibilisation.

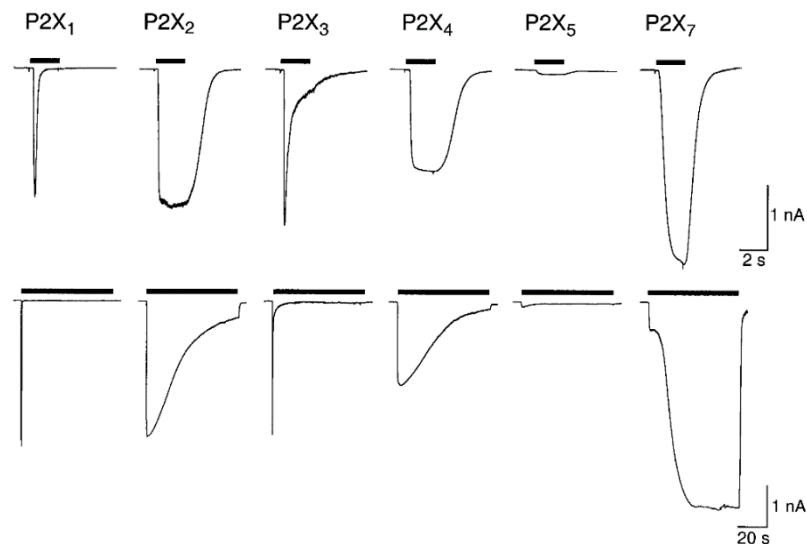
Cette ouverture du canal rend tous les récepteurs P2Xs perméables aux cations mono- et divalents. En général, pour un gradient électrochimique physiologique, cela engendre une entrée de  $\text{Na}^+$  et de  $\text{Ca}^{2+}$  dans la cellule et un efflux de  $\text{K}^+$ . En revanche, les perméabilités relatives varient selon le récepteur P2X considéré. Egan et Khakh se sont intéressés à la fraction  $\text{Ca}^{2+}$  des courants cationiques des différents récepteurs P2X homo et hétérotrimériques (Egan et Khakh, 2004). En fonction du récepteur P2X la perméabilité  $\text{Ca}^{2+}$  va varier (Tableau 1) (Egan et Khakh, 2004). De plus dans le cas du récepteur P2X5 humain on note la présence d'une perméabilité aux  $\text{Cl}^-$  (Bo et al., 2003).



	P2Xs homotrimériques							P2Xs hétérotrimériques		
	P2X1	P2X2	P2X3	P2X4	P2X5	P2X6	P2X7	P2X2/3	P2X2/6	P2X4/6
Fraction Ca <sup>2+</sup> (%)	12,4 ± 1,6	5,7 ± 0,3	2,7 ± 0,9	11 ± 0,7	4,5 ± 0,5	X	4,6 ± 0,5	3,5 ± 0,5	7,7 ± 0,7	11,3 ± 1

**Tableau 1** : Perméabilités au Ca<sup>2+</sup> en fonction des différents récepteurs P2X homo ou hétérotrimériques (Egan et Khakh, 2004).

Chaque trimère P2X présente des cinétiques de désensibilisation propres. Elle sera plus ou moins rapide en fonction des différents récepteurs (Figure 21) (North, 2002). Les récepteurs canaux homotrimériques P2X sont donc classés en trois catégories selon leurs vitesses de désensibilisation. Les récepteurs P2X1 et P2X3 vont désensibiliser très rapidement, les récepteurs P2X2, P2X4 et P2X5 modérément et le récepteur P2X7 ne désensibilise pas (Figure 21), et présente même une potentialisation après des stimulations successives (McCarthy, Yoshioka et Mansoor, 2019).



**Figure 21** : Désensibilisation en fonction des différents récepteurs P2Xs de rat. Les récepteurs P2X1 et P2X3 désensibilisent rapidement après application de 30µM ATP pour 2s. Les autres récepteurs P2X désensibilisent lentement. Pour le P2X7 1mM d'ATP a été appliqué et il est le seul à ne pas désensibiliser. (North, 2002).

### III.2.4 Les différentes sous-unités des récepteurs P2Xs

Il existe sept récepteurs P2X homotrimériques. Chacun a des caractéristiques fonctionnelles, d'expressions et des fonctions physiologiques et pathologiques qui leurs sont propre. Les sous-

unités P2X peuvent également s'assembler en hétérotrimères. Malgré le grand nombre de combinaisons trimériques certaines associations ne sont pas possibles, notamment avec la sous unité P2X7 (Torres, Egan et Voigt, 1999). Quelques hétérotrimères ont été caractérisés fonctionnellement dans des cellules primaires ou *in vivo*. En général, ils comportent au moins une sous unité P2X1, 2 ou 4 (P2X1/2, P2X1/4, P2X1/5 ; P2X2/3, P2X2/5, P2X2/6 ; P2X4/6) (Saul et al., 2013).

#### III.2.4.1 Le récepteur P2X1

Le récepteur P2X1 est constitué de 399 acides aminés chez l'humain. C'est un canal cationique non sélectif avec une perméabilité plus élevée pour le Ca<sup>2+</sup> qui désensibilise très rapidement (Tableau 1 et Figure 21) (Egan et Khakh, 2004).

Grâce à une lignée murine exprimant la sous unité P2X1 couplée à un fluorochrome, la carte d'expression de cette protéine a été établie (Mahaut Smith et al., 2019). P2X1 est présent dans les muscles lisses, la vessie, les plaquettes et les mégacaryocytes. En revanche, son expression dans le système nerveux central n'a pas été confirmée à ce jour (Mahaut Smith et al., 2019). Ce récepteur est très mobile à la membrane plasmique et est probablement cloisonné dans des radeaux lipidiques, sous-domaines membranaires riches en cholestérol, qui pourraient être impliqués dans son trafic et sa signalisation (Mahaut Smith et al., 2019).

P2X1 joue un rôle important dans le système nerveux autonome sympathique et parasympathique. Un KO de P2X1, dans un modèle murin, diminue l'amplitude des contractions sympathiques des canaux déférents et diminue la fertilité chez le mâle. Un double KO de P2X1 et de la sous-unité  $\alpha$  1A des récepteurs adrénergiques engendrent une infertilité totale. P2X1 semble donc clairement jouer un rôle primordial dans le système reproducteur mâle. De plus, il semble également impliqué dans la contraction des muscles lisses de la vessie engendrant la miction. Un KO de P2X1, mais pas l'administration d'antagonistes, inhibe ces contractions. Un récepteur hétérométrique avec au moins une sous unité P2X1 semble donc responsable de ces effets (Kennedy, 2021).

Ce récepteur est également impliqué dans l'agrégation plaquettaire et la thrombose vasculaire. Cependant, ses rôles semblent plutôt secondaires car, un KO de P2X1 dans un modèle murin n'entraîne pas de problème de coagulation ou de saignement spontané (Oury et al., 2015).

Finalement, en cas d'inflammation, la hausse d'ATP extracellulaire engendrée par une mort cellulaire excessive peut également activer P2X1. En revanche, il semble que cette implication soit dépendante du modèle utilisé et de la pathologie étudiée. Par exemple, un KO de P2X1 dans un modèle d'endotoxémie (présence d'endotoxines dans la circulation sanguine) induite par le LPS favorise l'apoptose (Lecut et al., 2012).

La formation d'hétérotrimères P2X1/2, P2X1/4 ou P2X1/5 a d'abord été démontrée dans des modèles d'expressions hétérologues, les ovocytes de *Xenopus* pour P2X1/2 et P2X1/4 et dans la lignée HEK293 pour P2X1/5. Plus récemment, les récepteurs P2X1/4 (Harhun et al., 2014) et P2X1/5 (Lalo et al., 2008) ont été mis en évidence *in vivo*.

#### III.2.4.2 Le récepteur P2X2

Le récepteur P2X2 est constitué de 471 acides aminés chez l'être humain. Il est connu pour sa capacité à répondre très rapidement à la présence d'ATP extracellulaire. C'est également le récepteur P2X qui a les courants les plus stables lors d'applications prolongées d'ATP. De plus, il désensibilise sur une gamme de temps assez longue (20 s) (Tableau 1 et Figure 21) (Egan et Khakh, 2004) (North, 2002). P2X2 est exprimé dans l'ensemble de l'organisme, aussi bien dans des cellules neuronales que non neuronales. Cependant, malgré une très forte expression dans le SNC, un KO de cette protéine dans une lignée murine n'induit pas de changement comportemental majeur (Cockayne et al., 2005).

Ce récepteur est principalement connu pour son rôle dans la perception du goût, en intervenant dans les interactions entre les cellules épithéliales et les neurones sensoriels. L'exposition des cellules réceptrices du goût à leurs stimuli respectifs engendre une libération d'ATP qui active les récepteurs P2X2 et P2X3 des papilles gustatives (Cockayne et al., 2005). Pourtant, un KO, soit de P2X2, soit de P2X3 n'affecte que très peu la perception du goût (Finger et al., 2005). Cependant, un double KO P2X2/P2X3 supprime totalement la perception du goût, sans pour autant perturber

la perception du tact, du chaud ou du froid (Cockayne et al., 2005) (Finger et al. 2005). Ces données suggèrent l'implication des récepteurs homotrimériques P2X2 et P2X3 mais surtout un rôle important pour le récepteur hétérotrimérique P2X2/3 dans cette fonction physiologique.

Par ailleurs, les récepteurs P2X2/3 (et P2X3) jouent un rôle important de la physiologie de la douleur, notamment en ce qui concerne la nociception (Burnstock, 2013). Ces récepteurs sont exprimés dans les terminaisons nerveuses des neurones sensitifs qui innervent la peau, les muscles et les articulations ainsi que dans les ganglions de la racine dorsale (DRG) pour le P2X3. Lorsqu'ils sont activés, l'entrée de  $Ca^{2+}$  dans les neurones sensitifs va conduire à la libération de neurotransmetteurs (Glutamate et substance P), ce qui peut contribuer à leurs sensibilisations et à des réactions anormales (hypersensibilité) (Burnstock, 2013).

P2X2 peut également former des hétérotrimères avec P2X5 ou P2X6. Des études réalisées par Compan et al., en 2012 démontrent la présence de P2X2/5 dans le système nerveux central murin (Compan et al., 2012). Le récepteur fonctionnel P2X2/6 a été décrit en 2000 par King et al., dans un modèle d'expression hétérologue (King et al., 2000) (Saul et al., 2013).

#### III.2.4.3 Le récepteur P2X3

Le récepteur P2X3, constitué de 397 acides aminés chez l'être humain. Comme P2X2, il s'active très rapidement en présence d'ATP extracellulaire mais, contrairement à ce dernier, désensibilise très rapidement (Tableau 1 et Figure 21) (Egan et Khakh, 2004) (Chen et al., 1995). P2X3 est principalement exprimé sur les somas et les terminaisons périphériques et centrales des neurones sensoriels primaires. Ce récepteur est principalement connu pour son rôle dans la dépolarisation et la propagation du potentiel d'action, mais est également capable de potentialiser des réponses neuronales grâce à des changements moléculaires intracellulaires qui vont amplifier la signalisation purinergique (Fabbretti, 2019).

La sous unité P2X3 peut également former des hétérotrimères avec la sous unité P2X2 (voir partie P2X2). P2X3 et P2X2/3 jouent des rôles clé dans la nociception (Burnstock, 2013).

#### III.2.4.4 Le récepteur P2X4

Le récepteur P2X4 comprend 388 acides aminés chez l'être humain. Il s'active également très rapidement en présence d'ATP extracellulaire. Cependant, la désensibilisation de ce récepteur semble dépendante de la stimulation. Par exemple, lorsqu'elle est modérée, la désensibilisation le sera aussi (Suurväli et al., 2017) (Kanellopoulos et al., 2021). P2X4 possède une perméabilité particulièrement élevée pour le  $\text{Ca}^{2+}$  ( $11\% \pm 0,7\%$ ) (Tableau 1) identique à celle des récepteurs NMDA (Egan et Khakh, 2004).

Les récepteurs P2X4 homotrimériques et hétérotrimériques cyclent très rapidement à la membrane plasmique. Ils sont rapidement internalisés après fixation d'un agoniste, d'abord dans les endosomes précoces, puis dans les lysosomes. Cette internalisation est clathrine et dynamine dépendante. Ce processus est permis par l'interaction entre la partie C terminale de P2X4 et la protéine adaptatrice 2. Toulmé et al., ont montré en 2006, qu'une troncature du P2X4 après l'acide aminé 377, ou lorsque la tyrosine 378 est remplacée par une alanine, cela entraîne une augmentation des courants par rapport au P2X4 non muté. De plus, l'augmentation des courants est dépendante de la quantité d'ADN utilisée lors de la transfection (Toulmé et al., 2006). Une mutation affectant ces motifs engendre une accumulation de récepteur P2X4 fonctionnel à la membrane plasmique (Toulmé et al., 2006) (Kanellopoulos et al., 2021).

P2X4 est exprimé dans le système nerveux central, dans les neurones et les cellules gliales (astrocytes, microglies, oligodendrocytes), dans les muscles lisses du système cardiovasculaire, dans plusieurs glandes (glandes surrénales, thyroïde...) (Kanellopoulos et al., 2021). Son activation est associée avec de nombreuses pathologies du système nerveux central. En effet, dans plusieurs modèles murins, l'expression microgliale de P2X4 est augmentée lors d'inflammations chroniques, de douleurs neuropathiques, ou de maladies neurodégénératives. Ces implications semblent dépendantes de la microglie car, l'expression de cette sous-unité est augmentée lors d'une activation microgliale (Tsuda et al., 2003) (Coull et al., 2005) (Suurväli et al., 2017) (Kanellopoulos et al., 2021). Cette activation correspond plutôt à un état M2 des microglies, anti-inflammatoire, car elle n'entraîne pas de réarrangement massif du cytosquelette et ne mène pas à la mort cellulaire (Bernier et al., 2012).

Une ouverture de P2X4 favorise également directement la sécrétion calcium-dépendante de neurohormones par les cellules neuroendocrines (Bjelobaba, Janijic et Stojilkovic, 2015).

La sous-unité P2X4 peut également s'associer avec la sous-unité P2X6 pour former des hétérotrimères. La première caractérisation de l'hétérotrimère P2X4/6 a été réalisée dans un système d'expression hétérologue (lignée HEK293) (Lê et al., 1998). Cet influx de  $Ca^{2+}$  à travers cet hétérotrimère est potentiellement impliqué dans la modulation de la transmission synaptique, et dans les processus d'adhésions cellulaires calcium-dépendants. L'existence d'un hétérotrimère P2X4/7 a également été étudié dans des modèles d'expression hétérologue, mais son existence a été largement remise en question par plusieurs équipes qui suggèrent plutôt une proximité et une interaction physique (interaction protéine-protéine) des deux homotrimères (Nicke, 2008) (Craigie et Wildman, 2013). De plus, l'existence d'hétérotrimères entre les sous unités P2X2, P2X4, P2X6 a également été mise en évidence en 2014 par Antonia et al., grâce à la microscopie à force atomique (Antonio et al., 2014).

#### III.2.4.5 Le récepteur P2X5

Chez l'être humain, le récepteur P2X5 est constitué de 422 acides aminés. Il s'active lentement en présence d'ATP extracellulaire et les courants des récepteurs homomériques sont très faibles par rapport aux autres récepteurs P2X (Tableau 1) (Figure 21). C'est également le seul récepteur P2X qui, en plus d'être perméable aux cations ( $Ca^{2+}$ ,  $K^+$ ,  $Na^+$ ...), est également perméable à l'anion  $Cl^-$  (King, 2022).

P2X5 semble jouer un rôle dans la réponse inflammatoire. En effet, un KO des récepteur P2X5 dans un modèle murin, diminue la perte osseuse associée à une inflammation de la boîte crânienne. D'autres indices vont dans ce sens, par exemple, un KO du récepteur P2X5 chez la souris, diminue les niveaux de cytokines pro inflammatoires circulantes (Kim et al., 2017) (Kim et al., 2018) (Jeong et al., 2020).

#### III.2.4.6 Le récepteur P2X6

Constitué de 441 acides aminés chez l'être humain. Il s'agit du récepteur P2X qui a été le moins étudié. En près de 25 ans d'études, seulement deux équipes indépendantes ont réussi à observer des réponses P2X6 (Collo et al., 1996) (Jones et al., 2004). Ces résultats s'expliquent par une nécessité de modification post-traductionnelles pour rendre ce canal fonctionnel. En effet, une

glycosylation influence la structure tertiaire et quaternaire des récepteurs et peut donc impacter la fonctionnalité du récepteur (Jones et al. 2004). Jusqu'à aujourd'hui, très peu de fonctions ont été associées au récepteur P2X6 homomérique. Par contre P2X6 forme des hétéromères avec les sous-unités P2X2 et P2X4 (voir ci-dessus).

#### III.2.4.7 Le récepteur P2X7

Le récepteur P2X7 est composé de 595 acides aminés chez l'être. L'affinité du P2X7 pour son ligand naturel, l'ATP, est extrêmement faible par rapport aux autres récepteurs P2Xs ( $EC_{50} > 100 \mu M$ ). En condition physiologique, ces concentrations extracellulaires d'ATP sont rarement atteintes. Cependant, en cas de lésion cellulaire, d'inflammation, de douleur neuropathique ou de cancer, la concentration d'ATP extracellulaire peut être suffisante pour activer, au moins partiellement, le récepteur P2X7. De plus, certaines molécules endogènes associées aux inflammations peuvent augmenter l'affinité de ce récepteur pour ses agonistes (Di Virgilio et al., 2017). Finalement, une particularité du récepteur P2X7 est également la facilitation de l'amplitude des courants ioniques membranaires liés au récepteur P2X7 après des applications répétées d'ATP (Surprenant et al., 1996).

Il a été suggéré que certains récepteurs P2X, notamment le P2X2, P2X4 et le P2X7 présentent un deuxième état ouvert, où le canal est dilaté et permet le passage de molécules de grande taille et chargées positivement, comme, le Yo-Pro1, l'éthidium ou le N-méthyl-D-glucamine (NMDG) (Di Virgilio et al., 2018). Néanmoins, il a été montré que cette apparente fonction du canal n'était pas une propriété intrinsèque du canal (Li et al., 2015) due à une interaction de P2X7 avec des canaux pannexin-1 (Iglesias et al., 2009) ou des hémicanaux connexin-43 (Di Virgilio et al., 2018). Cependant, les modèles actuels suggèrent, que ce canal peut faire transiter ces larges molécules cationiques sans dilatation significative. Cette capacité du récepteur P2X7 à laisser passer des larges molécules cationiques semble se mettre en place dès son activation, mais à une vitesse bien plus faible que le passage des cations mono- ou divalents (Di Virgilio et al., 2018). Finalement, une dernière hypothèse pour expliquer ces propriétés, celle de l'interaction entre le récepteur P2X7 et des canaux chlorure activés par le calcium (TMEM16 ou Anoctamine) a récemment été explorée (Dunning et al., 2021).

En plus de n'être sensible qu'à des concentrations d'ATP ne survenant qu'en condition pathologique, P2X7 est exprimé par les cellules immunitaires (lymphoïdes et myéloïdes). Son implication dans les réponses inflammatoires semble donc probable. P2X7 intervient notamment dans l'assemblage de l'inflammasome NLRP3, la sécrétion de la cytokine proinflammatoire IL-1  $\beta$ , la libération de chimiokines, la modulation de la phagocytose et la destruction des pathogènes intracellulaires (Di Virgilio et al., 2017). Ce récepteur est donc particulièrement important lors de l'initiation d'une réponse inflammatoire. Dans un modèle de souris KO P2X7, l'initiation de l'inflammation après application de divers stimuli immuns est altérée : la sécrétion de l'IL-1  $\beta$  mature est diminuée et donc la cascade inflammatoire engendrée par cette cytokine n'a pas lieu (Solle et al., 2001).

En plus de son expression dans les cellules du système immunitaire, ce récepteur est distribué de façon ubiquitaire dans de nombreuses cellules de l'organisme, mais pas dans les neurones (Kaczmarek-Hajek et al., 2018). Dans le système nerveux central, par exemple, les cellules ayant la plus forte densité en récepteur P2X7 sont les cellules microgliales, ensuite les astrocytes, les oligodendrocytes (Illes, Khan et Rubini, 2017). Des effets qui ont précédemment été attribués aux récepteurs P2X7 neuronaux, seraient donc indirects. Ils seraient dus à la stimulation par P2X7 de la sécrétion de gliotransmetteurs et d'autres molécules pouvant agir sur la transmission synaptique (Illes, Verkhratsky et Tang, 2020).

Dans le système nerveux central, ce récepteur est impliqué dans de nombreuses pathologies : neurodégénératives, génétiques, neurodéveloppementales, traumatiques, épilepsie, douleurs chroniques et douleurs neuropathiques... Toutes ces affections, causées par une neuroinflammation persistante, semblent donc dépendantes d'un pivot central : le récepteur P2X7 (Andrejew et al., 2020). Néanmoins, présentant l'affinité la plus faible pour son ligand endogène, l'ATP, l'activation de ce récepteur intervient lorsque la neuroinflammation est déjà en place. Agir sur le récepteur P2X7 semble limiter les conséquences de la neuroinflammation plutôt que de bloquer l'initiation de celle-ci.



### III.2.5 Pharmacologie des récepteurs P2Xs

L'étude de la signalisation purinergique s'est rapidement heurtée à un problème de taille. En effet, l'agoniste naturel de ces récepteurs, l'ATP et ses métabolites activent les P2X, certains P2Y et les récepteurs de l'adénosine. L'étude de ces différents récepteurs a donc nécessité le développement de molécules de synthèse dérivées de l'ATP permettant de cibler les différents types de récepteurs (Illies et al., 2021).

#### III.2.5.1 Agonistes des récepteurs P2Xs

Même si le site de liaison de l'ATP sur les récepteurs P2Xs est très conservé d'un récepteur à l'autre, les affinités respectives sont différentes (Tableau 1). En fonction du récepteur, l'affinité varie de 0,1 $\mu$ M à environ 10 $\mu$ M, sauf pour le récepteur P2X7 qui a une affinité très faible pour l'ATP ( $EC_{50} > 100\mu$ M) (Illies et al., 2021).

La plupart des agonistes des récepteurs P2X dérivent d'ATP mais sont plus stables dans le milieu extracellulaire par rapport à cette dernière qui est très rapidement dégradée dans le milieu extracellulaire (Zimmermann, 2000). De plus, les sous-produits de l'ATP (ADP, AMP, adénosine) agissent également sur d'autres récepteurs, P2X, P2Y... Ainsi, le 2-méthylthio-ATP et l'ATP $\gamma$ S ont une affinité comparable à l'ATP pour les différents récepteurs P2X (Tableau 2). Cependant, l' $\alpha,\beta$ -méthylène-ATP ( $\alpha\beta$ meATP) est plus sélective des récepteurs P2X1 et P2X3 et le  $\beta,\gamma$ -méthylène-ATP est très sélective du P2X1 et ne va activer aucun autre récepteur P2X à faible concentration (Tableau 2). Finalement, bien que le 2' (3')-O-(4-benzoylbenzoyl) ATP (BzATP) est décrit comme un agoniste sélectif du récepteur P2X7, il a, dans les faits, une affinité bien plus grande pour les récepteurs P2X1 et P2X3 (Tableau 2). Le BzATP est cependant un outil intéressant pour l'étude des récepteurs P2X7, car son affinité pour P2X7 est dix fois plus grande que celle pour l'ATP (Illies et al., 2021). De nos jours, malheureusement, aucun agoniste sélectif pour un sous-type unique de récepteur P2X n'a été décrit (Tableau 2). L'utilisation d'antagonistes sélectifs reste donc la meilleure (seule) solution pour étudier les fonctions des différents types de récepteurs P2Xs (Illies et al., 2021).

Par ailleurs, lorsque l'on s'intéresse à la pharmacologie des récepteurs purinergiques, on trouve énormément de littérature sur le rat et l'humain, mais très peu sur la souris. Dans tous nos tableaux présentés dans cette partie, les valeurs proviennent à la fois du rat et de l'humain et la question spécifique de la pharmacologie des récepteurs de la souris seront abordés dans la partie résultats.

Agoniste EC50 [ $\mu$ M]	P2X1	P2X2	P2X3	P2X4	P2X5	P2X6	P2X7
ATP	0,6	2-8	0,5-1	1-10	0,4-10	12	>100
2-MeSATP	0,07-1	1	0,35	0,3-4,5	0,5-10	9	178
ATP- $\gamma$ S	2,3	1,5	0,7	2,3	0,5-0,6	1,3	138
$\alpha$ - $\beta$ -MetATP	0,1-1	>300	0,74-2	1-100	160-300	>100	>300
$\beta$ - $\gamma$ -MetATP	2	>300	>300	>300	11,8	-	-
BzATP	0,002	0,75	0,08	1-100	6-40	25	5-52

*Tableau 2 : Principaux agonistes des récepteurs P2X et leur EC<sub>50</sub> moyen.*

Le courant induit par une activation de récepteurs P2X est modulé par un grand nombre de molécules (Tableau 3), comme les cations divalents, le pH, les stéroïdes et les neurostéroïdes, des hormones comme l'estrogène (Ma et al., 2011) (Seol et Chung, 2022) et finalement certains lipides comme le cholestérol (Murrell-Lagnado, 2017). Certaines de ces molécules ont des effets similaires sur tous les récepteurs P2Xs. Ainsi, une concentration élevée d'éthanol (>100mM) va inhiber les récepteurs P2Xs et particulièrement le P2X4 (Illes et al., 2021). Cependant, certains effets modulateurs dépendent de la composition en sous-unités du récepteur P2X concerné (Tableau 3). Par exemple, une déplétion du cholestérol à la membrane plasmique inhibe les courants des récepteurs P2X1 à 4. En revanche, une diminution des concentrations de ce lipide potentialise les réponses P2X7 (Robinson et al., 2014). L'ivermectine est un autre exemple de modulateur spécifique de certains récepteurs P2X. Cet agent antiparasitaire, utilisé notamment pour traiter la gale, est un modulateur allostérique positif des récepteurs P2X4. Elle peut

également activer le récepteur P2X7 humain à une concentration de 3  $\mu$ M, mais n'a pas d'effet sur le P2X7 de souris et de rat (Nörenberg et al., 2012).

D'autres modulateurs allostériques positifs ont été dérivés de certains antagonistes déjà connus. Le MRS2219, par exemple, potentialise les réponses P2X1. Le PBS-10129 augmente les courants P2X2. Le bleu de cibacron, un isomère présent dans le Bleu Réactif 2, augmente les réponses P2X3 chez l'humain et P2X4 chez le rat (Illés et al., 2021).

Modulateurs allostériques positifs EC50 ( $\mu$ M)	P2X1	P2X2	P2X3	P2X4	P2X5	P2X6	P2X7
Ivermectine	-	>30	>30	0,25	-	-	>30
MRS2219	5,9	>100	>100	>100	-	-	-
PSB-10129	-	0,489	-	-	-	-	-
Bleu de Cibracon	IC50 0,7mM	-	Pot	-	-	-	-
pH (H <sup>+</sup> )	↓ pKa 6,3	↑ pKa 7,3	↓ pKa 6,0	↓ pKa 6,8	-	-	↓ pKa 6,1

*Tableau 3 : Modulateurs allostériques positifs des récepteurs P2Xs. Le bleu de Cibracon inhibe le P2X1 (IC<sub>50</sub> de 0,7 mM) et potentialise le P2X3.*

### III.2.5.2 Antagonistes des récepteur P2Xs

Les premiers antagonistes des récepteurs P2X qui ont été caractérisés, sont non sélectifs, comme la suramine, le bleu réactif 2 (réactive bleu 2, RB-2) ou le PPADS (Tableau 4). Cependant, ces composés vont quand même cibler préférentiellement certains récepteurs en fonction de la concentration utilisée (Tableau 4). Par exemple, l'IP<sub>5</sub>I, 2', 3'-O-benzylidene-ATP et l'acide aurintricarboxylique inhibent la réponse de tous les récepteurs P2Xs, à des concentrations allant du nanomolaire à une centaine de micromolaire (Tableau 4). Cependant, le (2'-(or-3')-O-(Trinitrophényl) Adénosine 5'-Triphosphate (TNP-ATP), agit sur l'ensemble des récepteurs P2X, mais préférentiellement sur P2X1 et P2X3 (nM) (Tableau 4) (Illies et al., 2021).

Antagoniste IC <sub>50</sub> [μM]	P2X1	P2X2	P2X3	P2X4	P2X5	P2X6	P2X7
Suramine	1-2	10	3	>300	2-3	-	>300
PPADS	1	1	1	>500	3	>100	10-50
RB-2 14b	30	0,5	-	-	18,3	-	-
Acide aurintricarboxylique	0,009	21,7	0,073	763	-	-	118
TNP-ATP	0,005	1-2	0,001	1-15	0,45	-	>30
2'.3'-O-Benzylidene-ATP	0,002	5,5	0,08	0,49	40	25	52
IP <sub>5</sub> I 10	0,003	>300	2,8	Pot	>30	-	

**Tableau 4** : Antagonistes non sélectifs des récepteurs P2X et leurs IC<sub>50</sub>

### III.2.5.3 Antagonistes sélectifs de P2X1

Très peu d'antagonistes sélectifs pour le récepteur P2X1 ont été découverts à ce jour (Tableau 5). Bien que décrites comme sélectif du récepteur P2X1, la plupart de ces molécules ont également un effet sur d'autres récepteurs P2X. Ces effets sont, cependant, souvent à nuancer car ils surviennent à des concentrations très élevées (Tableau 5) (Illes et al., 2021).

Antagoniste P2X1 IC <sub>50</sub> (μM)	P2X1	P2X2	P2X3	P2X4	P2X5	P2X6	P2X7
PSB-2001	0,019	>10	>10	0,15	-	-	0,18
PSB-2014	0,023	>10	>10	0,2	-	-	0,2
PSB-2013	0,058	>10	>10	0,05	-	-	0,18
NF279	0,02-12	1	2	>300	-	-	-
NF023	0,2	>50	10-30	>100	-	-	>100
MRS2159	80	>100	>100	-	-	-	

*Tableau 5 : Antagonistes sélectifs du récepteur P2X1 et leurs IC<sub>50</sub>*

#### III.2.5.4 Antagonistes sélectifs de P2X2

Bien que par le passé, le PPADS, le RB-2, le TNP-ATP ou bien la suramine, qui ont une bonne affinité pour le récepteur P2X2, ont été utilisés comme des antagonistes sélectifs, ces molécules ont également des effets sur d'autres récepteur P2Xs (Tableau 4). Cependant, des dérivés de ces composés ont des actions beaucoup plus spécifiques, comme le PSB10211 et le PSB1011 (dérivé du RB-2) ou le NF770 (dérivé de la suramine) (Illes et al., 2021).

Antagoniste P2X2 IC50 ( $\mu$ M)	P2X1	P2X2	P2X3	P2X4	P2X5	P2X6	P2X7
NF770	1	0,02	0,08	>100	-	-	>100
PSB10211	-	0,09	-	-	-	-	-
PSB1011	0,4	0,08	0,5	>10	-	-	>10

*Tableau 6 : Antagonistes sélectifs du récepteur P2X2 et leurs IC<sub>50</sub>*

### III.2.5.5 Antagonistes sélectifs de P2X3

La pharmacologie du récepteur P2X3 est plus élargie. En effet, plusieurs antagonistes très sélectifs de P2X3 ont été mis en évidence. L'A-317491, par exemple, est un antagoniste compétitif, mais sa biodisponibilité n'en fait pas un bon candidat pour des études *in vivo* ou *ex vivo*. Cela est probablement dû à la forte affinité qu'a cette molécule pour les protéines du plasma sanguin. En revanche, d'autres molécules n'ont pas cet inconvénient. Le 2', 3'benzylidene-ATP et ses dérivés (DT0111,...) par exemple, sont sélectifs du récepteur P2X3 et des hétérodimères P2X2/3 (DT0111). D'autres composés comme l'AF353, l'AF906 et le BLU-5937 ont une affinité 100 fois supérieure pour le récepteur P2X3 que pour d'autres P2Xs et sont donc encore plus sélectifs (Tableau 7) (Illes et al., 2021).

Antagoniste P2X3 IC50 (μM)	P2X1	P2X2	P2X3	P2X4	P2X5	P2X6	P2X7
A-317491	>10	>100	0,1	>100	-	>100	>100
2'.3'-O- Benzylidene-ATP	0,002	5,5	0,08	0,49	40	25	52
DT0111	-	-	0,3	-	-	-	-
Gefpixant	>10	0,1-0,25	0,03	>10	>10	-	>10
AF353	>10	>10	0,006	-	>10	-	>10
AF906	>10	>10	0,002	>20	-	-	>10
BLU-5937	>20	>24	0,025-0,1	>20	-	-	>20

**Tableau 7 :** Antagonistes sélectifs du récepteur P2X3 et leurs IC<sub>50</sub>

D'autres molécules comme par exemple le TC-P 262, dérivées de diaminopyridine, présentent une forte sélectivité pour le P2X3 (pIC<sub>50</sub> 7,39) et le P2X2/3 (pIC<sub>50</sub> 6,68) et n'agit pas sur les autres récepteurs P2X (pIC<sub>50</sub> < 4,7) (Ballini et al., 2011).

### III.2.5.6 Antagonistes sélectifs de P2X4

L'antagoniste le plus sélectif et le plus utilisé du récepteur P2X4 est de loin le 5-BDBD, dérivé de benzodiazépine. Il a une affinité dix à vingt fois plus importante pour ce récepteur que pour d'autres P2X. Des dérivés de ces molécules existent également, comme le NP-1815-PX qui a une meilleure solubilité dans l'eau (Illes et al., 2021). D'autres composés sélectifs du récepteur P2X4 ont également été décrits, mais présentent également une certaine affinité pour d'autres récepteurs P2X (Tableau 8) (Illes et al., 2021).

Antagoniste P2X4 IC <sub>50</sub> (μM)	P2X1	P2X2	P2X3	P2X4	P2X5	P2X6	P2X7
5-BDBD	>10	>10	>10	0,4-3,5	-	-	>10
NP-1815-PX	6,5	7,3	>30	0,26	-	-	>30
PSB12054	>10	>10	>10	0,19	-	-	>10
PSB12062	>10	>10	>10	1,4	-	-	>10
PSB15417	10,3	>10	4,14	0,02-0,1	-	-	2,13
BX430	>10	>10	>10	0,78	>10	-	>50
BAY-1797	>50	>30	8,3	0,1-0,23	-	-	10,6

*Tableau 8 : Antagonistes sélectifs du récepteur P2X4 et leurs IC<sub>50</sub>*



### III.2.5.7 Antagonistes sélectifs de P2X7

Etant le plus étudié des récepteurs P2X, un grand nombre d'antagonistes très sélectifs du récepteur P2X7 ont été développés de nos jours (Tableau 9) (Illes et al., 2021).

Antagoniste P2X7 IC <sub>50</sub> (μM)	P2X1	P2X2	P2X3	P2X4	P2X5	P2X6	P2X7
A-438079	>100	>100	>100	>100	-	>100	0,06-0,5
A-804598	>100	>100	>100	>100	-	>100	0,01
A-740003	>100	>100	>100	>100	-	>100	0,04-0,02
AZ-11645373	>10	>10	>10	>10	>10	-	0,1
CE-224,535	>10	-	-	-	-	-	0,002-0,01
GSK1482160	-	-	-	-	-	-	0,003
AZ9056	-	-	-	-	-	-	0,012
AZ10606120	-	-	-	-	-	-	0,0014
JNJ47965567	-	-	-	-	-	-	0,005
JNJ54175446	-	-	-	-	-	-	0,003

*Tableau 9 : Antagonistes sélectifs du récepteur P2X7 et leurs IC<sub>50</sub>*

### III.2.5.8 Conclusion concernant la pharmacologie P2X

Un grand nombre de molécules sont donc capables de moduler les courants induits par les récepteurs P2Xs. Malheureusement, la plupart d'entre elles ont des effets sur plusieurs types de récepteurs P2X, bien qu'à des concentrations différentes. Seuls les récepteurs P2X3, P2X4 et P2X7 ont des antagonistes hautement sélectifs permettant d'étudier leurs fonctions (Illes et al., 2021). Cependant l'existence de récepteurs hétéromériques ayant une pharmacologie mixte, c'est-à-dire ayant les propriétés des deux types de sous-unités qui les composent, complique encore un peu la situation. Actuellement l'utilisation de cocktails d'antagonistes à des concentrations auxquelles ils sont spécifiques d'un seul type de récepteur P2X est la seule stratégie utilisée pour étudier les réponses composites (c'est-à-dire impliquant plusieurs sous-types de récepteurs P2X).

### III.2.6 Neuroinflammation et signalisation purinergique

La signalisation purinergique fait donc intervenir divers récepteurs, comme les récepteurs-canaux P2Xs, les récepteurs métabotropes P2Ys et les récepteurs P1s de l'adénosine qui ont des effets parfois complémentaires mais également opposés. Ces récepteurs sont exprimés différemment, en fonction de la région du SNC et par de nombreux types cellulaires. La signalisation purinergique dans le système nerveux est donc complexe et témoigne d'une certaine plasticité permettant d'intégrer et de répondre au changement d'activité neuronal. De plus, les affinités respectives de divers ligands endogènes pour chaque récepteur font que ce système permet un contrôle spatial et temporel précis du réseau cérébral (Fields et Burnstock, 2006) (Rodrigues, Tomé et Cunha, 2015).

En plus des fonctions en situation physiologique, la signalisation purinergique est également un élément clé lors d'une atteinte pathologique du SNC. En effet, la libération d'ATP et la formation extracellulaire de ses dérivés, permet de stimuler certains récepteurs purinergiques à faible affinité et donc d'activer les cellules qui les expriment. Dans ce cas, l'ATP intracellulaire va se déverser dans l'espace extracellulaire et augmente localement de façon importante (Cook et McCleskey, 2002), avant de diminuer grâce à l'action des exonucléotidases. En revanche, après dégradation, les sous-produits (ADP, adénosine) vont agir sur leurs récepteurs respectifs (Rodrigues, Tomé et Cunha, 2015). Ce phénomène se produit dans diverses pathologies, comme l'ischémie cérébrale (Melani et al., 2005), les douleurs inflammatoires ou neuropathiques (Muñoz, Griffith et Contreras, 2021), les maladies génétiques, les maladies neurodégénératives (Alzheimer, Parkinson) et d'une façon plus large, toutes les pathologies ayant une neuroinflammation associée (Burnstock, 2008). L'ATP va être libérée en cas de dommages cellulaires.

Cependant, ce relargage de purines ne se fait pas seulement par des fuites, des lyses cellulaires ou des dommages membranaires, mais également par des mécanismes cellulaires finement régulés (Burnstock, 2008). L'ATP pourrait donc, être libérée dans l'espace extracellulaire par des canaux, transporteurs ou par exocytose (Rodrigues, Tomé et Cunha, 2015). De façon intéressante, parmi les rares transporteurs d'ATP exprimés dans le SNC, les transporteurs à cassettes liant l'ATP (ATP binding cassette, ABC) sont exprimés par des cellules gliales et libèrent l'ATP en cas de

dérégulation osmotique (Ballerini et al., 2002). D'autres transporteurs transmembranaires pour les nucléosides, tels que l'adénosine, sont également présents dans le système nerveux central (Thorn et Jarvis, 1996). Certains nucléosides sont libérés grâce au gradient électrochimique engendré par une différence de leurs concentrations à l'intérieur et à l'extérieur de la cellule, alors que d'autres utilisent le gradient sodium pour un transport actif secondaire.

L'ATP est également capable de franchir la membrane plasmique grâce à des canaux. Les hémicanaux connexines qui font partie de la famille des jonctions communicantes permettent le passage des petites molécules neuroactives chargées négativement telles que le glutamate ou l'ATP (Stout, Goodenough et Paul, 2004). Dans les astrocytes, par exemple, ils propagent des vagues d'ATP d'une cellule à l'autre en cas de stimulation mécanique (Stout et al., 2002). Plus généralement, les cellules gliales sont connues pour libérer de l'ATP par les hémicanaux connexines et les canaux pannexines. Actuellement, ces hémicanaux et canaux sont des cibles thérapeutiques pour limiter la sécrétion de l'ATP dans le milieu extracellulaire et limiter les dommages qui en découlent (neuro inflammation, mort cellulaire...) (Shestopalov et Slepak, 2014).

Les neurones quant à eux, libèrent de l'ATP par voie d'exocytose régulée (vésiculaire) (Pankratov et al., 2006). Cependant ce mode de libération ne leur est pas exclusif car la microglie et les astrocytes peuvent également utiliser ce mode de libération (Imura et al., 2013).

D'autres mécanismes de libération ont également été proposés comme l'association physique de deux canaux. Le récepteur P2X7 peut être associé avec un canal chlorure activé par le calcium, le TMEM16F (Dunning et al., 2021). Ce dernier possède également une fonction de scramblase intrinsèque et est capable de réorganiser les phospholipides des feuilletts intra- et extracellulaires de la membrane plasmique. Cette deuxième fonction, qui n'a pas été vérifié expérimentalement jusqu'à maintenant, pourrait engendrer la libération de petites molécules intracellulaires comme l'ATP. Néanmoins, l'endroit exact de passage n'est pas encore claire (pore du P2X7, canal du TMTE16F, micropores formés dans la membrane plasmique...). Il est cependant très peu semblable que l'ATP passe directement par le pore du récepteur P2X7 au regard de la structure

cryo-EM dans l'état ouvert (le pore à un diamètre de 5 Å environ) (McCarthy, Yoshioka et Mansoor, 2019).

La signalisation P2X peut être soit la cause, soit la conséquence du maintien et/ou de la propagation de l'état inflammatoire dans le système nerveux. En effet, dans la microglie centrale et les macrophages périphériques, les récepteurs P2X4 et P2X7 sont exprimés et jouent des rôles fondamentaux dans les processus immunitaires (Dubyak, 2007) (Hung et al., 2013). La formation d'hétérotrimères a été envisagée pour ces deux sous unités P2X (Dubyak, 2007), mais écartée dans un second temps au bénéfice d'une interaction mutuelle entre les deux protéines homotrimériques P2X4-P2X7 (Nicke, 2008) (Craigie et Wildman, 2013). Hung et al., ont démontré grâce à des approches de co-immunoprécipitation une proximité physique des récepteurs P2X4 et P2X7. De plus, une activation P2X7 est un prérequis pour l'activation de la caspase-1 et donc la mise en place de l'apoptose. Cependant, l'activité du récepteur P2X7 est modulée par la présence de P2X4 et des canaux pannexine-1 (Hung et al., 2013). Ces deux récepteurs ont une affinité pour l'ATP qui varie de quelques dizaines de micromolaire pour le P2X4 au millimolaire pour P2X7, offrant ainsi la possibilité à ce complexe de répondre au large éventail de concentration d'ATP auquel il est exposé en condition physiologique et pathologique.

Néanmoins, trois différences majeures existent pour ces récepteurs. Bien qu'étant tous les deux exprimés dans le SNC, le récepteur P2X4 est exprimé par les cellules nerveuses et les cellules gliales et le récepteur P2X7 uniquement par les cellules gliales (Jooss et al., 2023) (Illes et al., 2012), même si l'expression neuronale a été envisagée par le passé. Sans stimulation, le récepteur P2X4 n'est pas exprimé à la membrane plasmique, mais a plutôt localisation lysosomale dans les cellules microgliales (Qureshi et al., 2007). Le récepteur P2X7 est présent à la membrane plasmique même dans les cellules quiescentes. Le récepteur P2X4 est transloqué et stabilisé à la membrane plasmique seulement après induction de l'inflammation (Raouf et al., 2007). En effet, Raouf et al., ont montré que dans la lignée microgiale BV-2, la stimulation au LPS ne change pas l'amplitude de la réponse P2X7 alors que l'amplitude de la réponse P2X4 est augmentée. Cette augmentation de la réponse fonctionnelle est corrélée avec une augmentation d'expression de l'ARN messager codant pour P2X4 et de la protéine P2X4 (Raouf et al., 2007). Par ailleurs seule l'activation de P2X7 entraîne la mort cellulaire (Bernier et al., 2012).

Le récepteur P2X4 est connu pour son rôle dans la migration cellulaire et la sécrétion de BDNF grâce à son interaction avec le récepteur métabotrope P2Y12 dans les cellules microgliales (Ohsawa et al., 2007). Un KO ou une inhibition pharmacologique de P2X4 entrave la migration chimiotaxique de la microglie (Ohsawa et al., 2007). La sécrétion, de BDNF par les cellules microgliales de la moelle épinière est également dépendante de l'activation du récepteur P2X4. Sous l'action du BDNF, l'expression du transporteur KCC2 neuronal va diminuer causant un déséquilibre dans la balance chlorure. Les neurotransmetteurs inhibiteurs (GABA et glycine) vont dépolariser les neurones au lieu de les inhiber, augmentant aussi l'excitabilité neuronale (Coull et al., 2005). D'un point de vue fonctionnel, l'augmentation de l'excitabilité neuronale va engendrer des transmissions nerveuses aberrantes causant des douleurs neuropathiques (douleurs spontanées, hyperalgésie et allodynie tactile) (Coull et al., 2005).

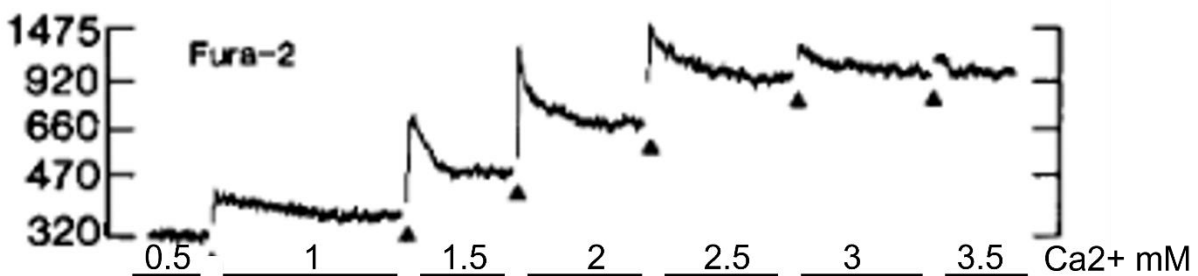
La microglie intervient également dans la différenciation des oligodendrocytes, cellules myélinisantes du SNC. Cette différenciation est P2X4 dépendante. Une inhibition de P2X4 engendre une baisse du nombre d'oligodendrocytes et un déficit ou une anomalie de myélinisation (Zabala et al., 2018). Dans les pathologies démyélinisantes comme la sclérose en plaque, le récepteur P2X4 exprimé par la microglie intervient également dans la remyélinisation. Par exemple, dans un modèle murin de maladie auto-immune (Encéphalomyélite auto-immune expérimentale, EAE), l'inhibition du récepteur P2X4 favorise un phénotype proinflammatoire et inhibe la phagocytose des débris de myéline, alors qu'une activation de P2X4 favorise un phénotype anti-inflammatoire (Zabala et al., 2018). A l'inverse, dans un modèle d'épilepsie, l'activation du récepteur P2X4 n'est pas protectrice mais neurotoxique (Ulmann et al., 2013). Des souris KO pour P2X4 présentent moins de dégénérescence neuronale que les souris témoins. Le récepteur P2X4 semble donc participer à l'induction de dommages excitotoxiques au sein du système nerveux central (Ulmann et al., 2013). Lorsque P2X4 n'est plus internalisable dans les neurones, la transmission synaptique sera altérée et aura des répercussions sur le plan cognitif (anxiété, troubles psychiatriques et neurodégénératifs) (Bertin et al., 2021). Des problèmes d'internalisation du récepteur P2X4 sont également impliqués dans la sclérose latérale amyotrophique. Les protéines mal repliées vont interagir avec la protéine adaptatrice 2, et l'internalisation du récepteur P2X4 sera déficiente (Bertin et al., 2022).

De façon très intéressante, le récepteur P2X7 est exprimé par les cellules gliales, principalement par la microglie mais également par les astrocytes (Illes et al., 2012). Son activation nécessite une concentration extracellulaire très élevée par rapport aux autres récepteurs P2X. De telles concentrations sont uniquement présentes en condition pathologique. De même, l'activation de P2X7 est impliquée dans la libération de cytokines proinflammatoires. En effet, une activation microgliale par stimulation du récepteur TLR4 par le LPS engendre une accumulation cytoplasmique de pro-IL-1  $\beta$ . Pour induire la maturation et la sécrétion de cette cytokine proinflammatoire, le récepteur P2X7 doit être activé (Giuliani et al., 2017). Cette stimulation purinergique, survenant seulement en situation inflammatoire est nécessaire pour l'assemblage de l'inflammasome NLRP3 et l'activation de la caspase-1, sous-jacent à la sécrétion d'IL-1  $\beta$  (Giuliani et al., 2017). La libération d'autres cytokines est également dépendante de l'activation du récepteur P2X7, mais ne semble pas nécessiter une co-stimulation de TLR4 (TNF  $\alpha$ , IL-6, CCL2...) (Shieh et al., 2014). Une inhibition des courants P2X7 diminue les sécrétions d'IL-6 et de CCL2 mais pas du TNF  $\alpha$  lorsque ce récepteur est stimulé avec du BzATP. Ces données suggèrent la présence d'au moins un partenaire moléculaire non identifié qui est impliqué dans la libération de TNF  $\alpha$  (Shieh, 2014). La fuite de molécules intracellulaires et de cytokines proinflammatoires suite à la stimulation de P2X7 entraîne une nécrose cellulaire des neurones environnants, ainsi que de la microglie elle-même par l'intermédiaire de «récepteurs suicides» (He et al., 2017). Ce phénomène est très étudié dans les maladies neurodégénératives comme la maladie de Parkinson (Crabbé et al., 2019). Finalement, le récepteur P2X7 est aussi impliqué dans l'apoptose caspase-dépendante (Savio et al., 2018). Néanmoins, il faut souligner que l'activation de P2X7 peut également être bénéfique et neuroprotectrice (Savio et al., 2018). Ainsi, la sécrétion de TNF  $\alpha$ , P2X7-dépendante, est protectrice dans certaines pathologies neurodégénératives (Masuch et al., 2016).

Les cellules microgliales expriment également des récepteurs purinergiques métabotropes et des récepteurs de l'adénosine qui participent à l'initiation, au maintien et à la résorption de l'inflammation (Burnstock, 2017).

### III.3 Récepteur sensible au calcium (CaSR)

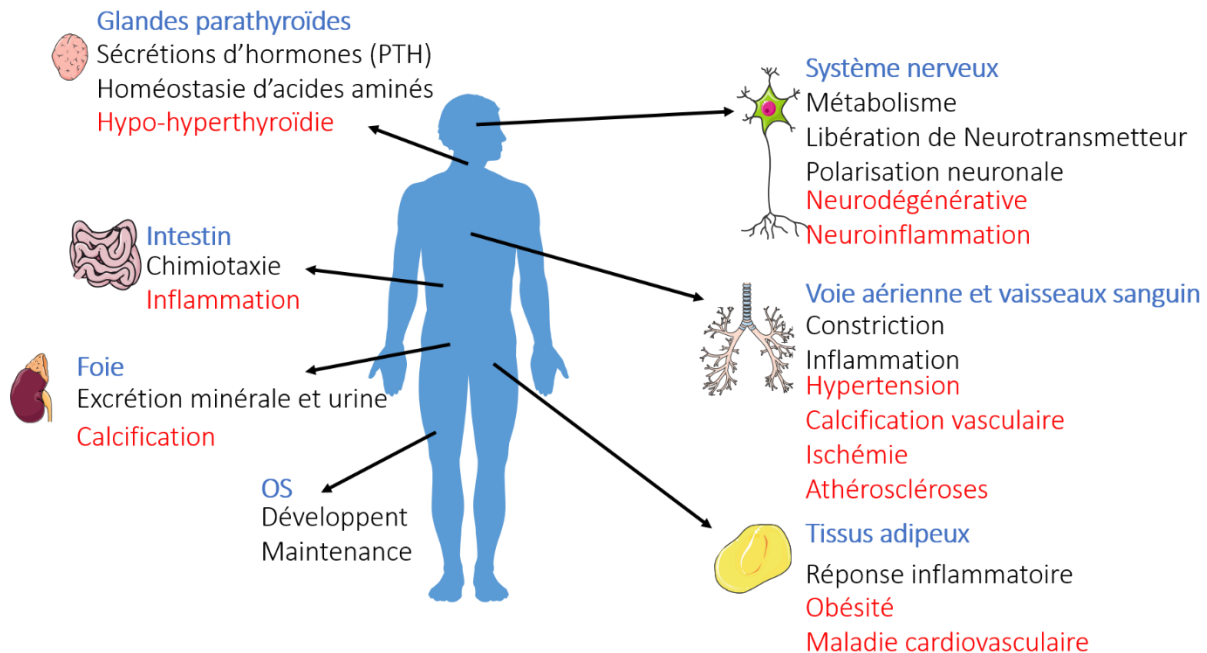
Le récepteur sensible au calcium extracellulaire (CaSR pour *calcium sensing receptor*) est un récepteur couplé aux protéines G (RCPG) de la classe C, connu principalement pour son implication dans l'homéostasie du calcium. Sa découverte a d'ailleurs été faite dans la glande parathyroïde de bœuf. En 1987, Nemeth et al., ont exposé des cellules issues de la glande parathyroïde de bœuf, préalablement incubées avec du Fura-2, une sonde ratiométrique du calcium libre intracellulaire, à des concentrations croissantes de  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulaire et ont observé que cela entraîne une augmentation du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire (Figure 22) (Nemeth et Scarpa, 1987).



*Figure 22* : Effets d'une augmentation du calcium extracellulaire sur la concentration de calcium intracellulaire. Plus le calcium extracellulaire augmente, plus le calcium intracellulaire augmente. Adaptée de Nemeth et Scarpa, 1987.

En 1993, Brown et al., ont cloné et décrit le récepteur sensible au calcium (CaSR), isolé à partir de la glande parathyroïde (Brown et al., 1993). D'ailleurs, les premières études s'intéressent à son implication dans l'homéostasie du calcium extracellulaire. Rapidement, la communauté scientifique s'est également penchée sur d'autres potentielles implications biologiques. Ce récepteur est exprimé dans de nombreux tissus (foie, cœur, muscles, circulation sanguines, os, système nerveux central...) où il régule un grand nombre de fonctions biologiques (Figure 23). Il est donc une cible de choix pour traiter diverses pathologies affectant ces organes (Hannan et al., 2019). Il est également exprimé dans le règne végétal, dans les chloroplastes où il participe à la

transduction du signal lumineux, intervient dans les mouvements des stomates et régule le stress abiotique (manque d'eau, sel...) et biotique (signalisation immunitaire des plantes) (Li et al., 2022).



**Figure 23 :** Exprimé dans l'ensemble de l'organisme, le CaSR va remplir diverses fonctions tissu-spécifiques et va être impliqué dans diverses pathologies.

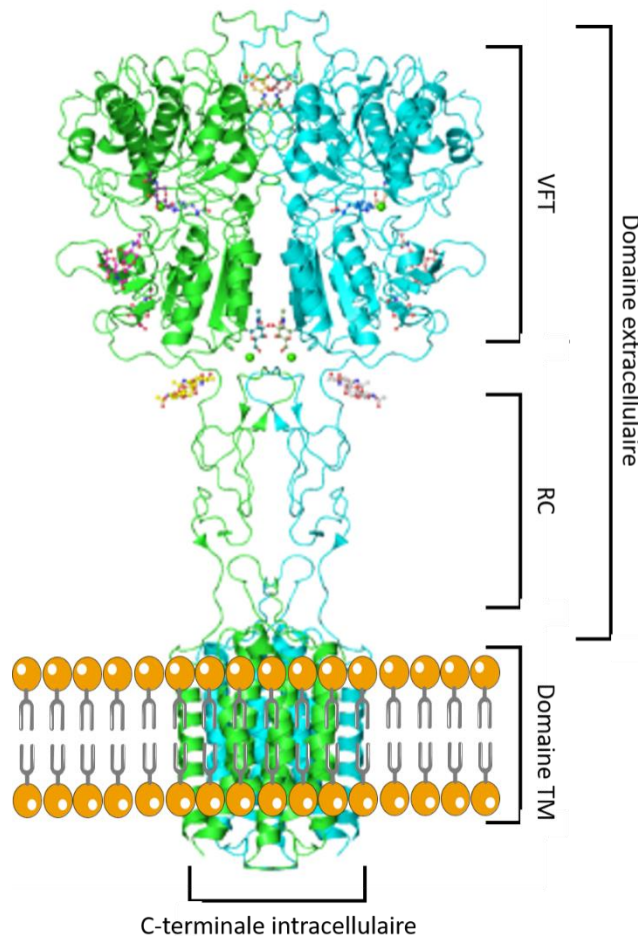
L'expression de ce récepteur permet au calcium d'être non seulement un messager intracellulaire lorsque son augmentation cytosolique active des voies intracellulaires (second messager intracellulaire), mais également un messager extracellulaire. Le CaSR, en plus d'être activé par le calcium extracellulaire, est également activé par d'autres molécules endogènes cationiques (Hannan et al., 2018). Il est couplé à plusieurs protéines G et pourra activer plusieurs voies intracellulaires et réguler de nombreux processus cellulaires (Hannan et al., 2018).



### III.3.1 Structure

Le CaSR est un récepteur couplé aux protéines G, de la classe C dont font également partie les récepteurs métabotropes du glutamate et ceux du GABA (Chun, Zhang et Liu, 2012).

Chaque sous-unité est composée d'un large domaine extracellulaire glycosylé, d'un domaine transmembranaire (domaine TM) composé de sept segments transmembranaires et d'une partie C-terminale intracellulaire. La partie extracellulaire est composée du vénus fly trap (VFT) ou se lie le ligand et d'une région contenant neuf cystéines (RC) à l'interface du VFT de la membrane plasmique (Figure 24). Les glycosylations extracellulaires sont importantes pour l'adressage à la membrane plasmique, son trafic intracellulaire et sa structure (Chun, Zhang et Liu, 2012).



*Figure 24 : Structure du CaSR (cryo-EM). Le CaSR est composé d'un large domaine extracellulaire composé du VFT et d'une région riche en cystéines (RC) à l'interface du VFT et des sept segments transmembranaires (TM). La région C-terminal est intracellulaire. (Chen et al., 2021)*

Pour pouvoir initier la signalisation intracellulaire médiée par les protéines G, les RCPGs doivent être exprimés à la membrane plasmique. Le repliement correct ainsi que les modifications tertiaires sont essentielles pour une bonne expression. La glycosilation de la partie extracellulaire est primordiale pour un bon adressage membranaire. Onze sites de glycosilation sont connus dont trois sont nécessaires pour l'adressage. Lors de sa maturation, les sous-unités vont dimériser dans le réticulum endoplasmique grâce à des interactions non covalentes et des ponts disulfures (Geng et al., 2016).

Le nombre de RCPG exprimés à la membrane va dicter l'amplitude des réponses intracellulaires. Pour le CaSR, plusieurs facteurs peuvent influencer son expression membranaire. Premièrement, des mutations peuvent affecter son expression. Un grand nombre de mutations diminue l'expression membranaire, mais cette dernière peut être restaurée grâce à l'utilisation de drogues calcimimétiques ou calcilytiques (Huang et Breitwieser, 2007). La phosphorylation de la sérine 899, par la protéine kinase A (PKA), va amplifier son expression à la membrane (Stepanchick et al., 2010). Enfin, un dernier mécanisme, médié par les agonistes, va également augmenter son expression à la membrane. Ce mécanisme s'appelle *agonist-driven insertional signalling* (ADIS). Lorsque un agoniste va lier des récepteurs à la membrane, des récepteurs nouvellement synthétisés vont être recrutés plus rapidement à la membrane (Grant et al., 2011).

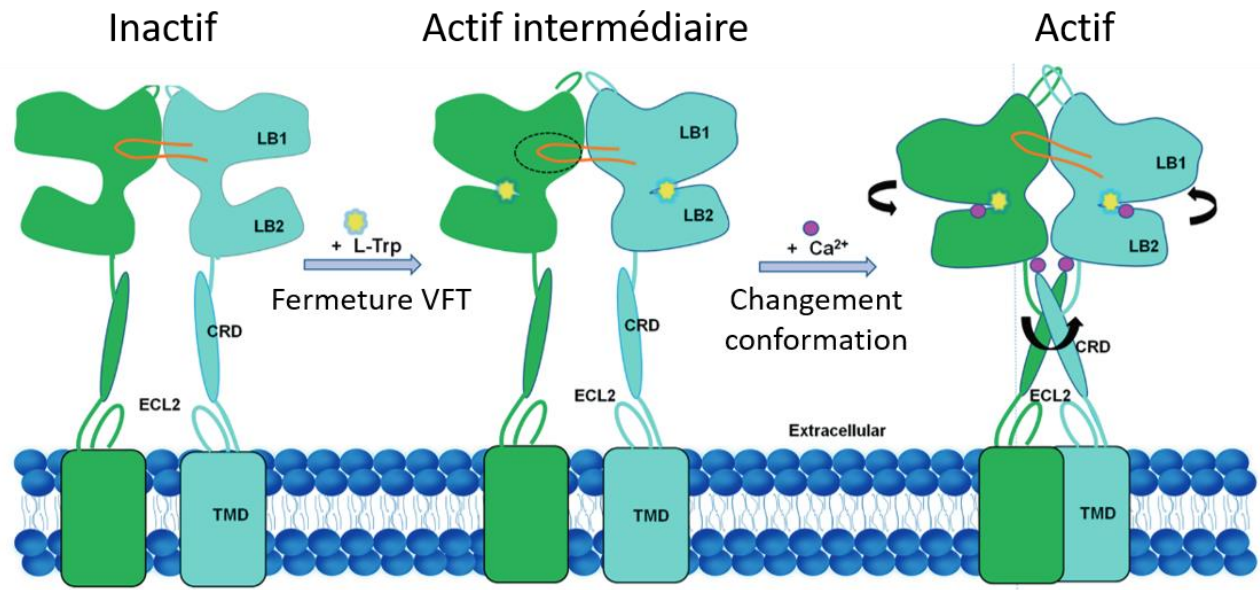
Concernant l'endocytose, les mécanismes ne sont pas encore bien connus. Cependant l'endocytose d'un RCPG met en général fin à son activité, et il sera ou recyclé ou dégradé. L'endocytose des RCPGs est finement régulée par des protéines accessoires ou des motifs conservés (Marchese et al., 2008) (Magalhaes, Dunn et Ferguson, 2012).

Dans la région C-terminale du CaSR humain, un motif de dégradation lysosomale a été identifié (Zhuang, Northup et Ray, 2012). La séquence de ce motif recouvre celle du site de liaison de la filamine A, suggérant son implication dans l'adressage membranaire et dans l'endocytose (Hjälml et al., 2001). La filamine A favorise l'adressage du CaSR aux cavéoles, régions membranaires impliquées dans l'endocytose clathrine-dépendante, renforçant l'hypothèse de son implication dans l'internalisation (Kifor et al., 1998). Le CaSR interagit également avec la molécule associée

au domaine SH3 de STAM (AMSH-1) impliquée dans la dégradation après ubiquitination ([Herrera-Vigener et al., 2006](#)).

Lorsqu'il est exprimé à la membrane plasmique, il peut également hétérodimériser avec d'autres RCPG de la classe C comme certains récepteurs métabotropes glutamatergiques du groupe 1 (mGluR5, mGluR1 $\alpha$ ) dans les neurones cérébelleux et hippocampiques, mise en évidence par co-immunoprécipitation (CaSR-mGluR1 $\alpha$ ) ([Gama, Wilt et Breitwieser, 2001](#)). D'autres RCPG de la classe C, comme les récepteurs GABA<sub>B</sub> sont également étudiés comme partenaires moléculaires ([Chang et al., 2007](#)) et sont impliqués dans l'expression membranaire du CaSR ([Goolam et al., 2022](#)).

Pour activer le récepteur, deux ions calciums doivent se lier. Zhang et al., ([Zhang et al., 2016](#)) et Geng et al., ([Geng et al., 2016](#)) ont également décrit un site orthostérique pour lier le L-tryptophane (Trp) impliqué dans l'activation et dans la stabilisation du récepteur dans sa conformation activée (Figure 25). La liaison de L-tryptophane permet de rapprocher les deux domaines du VFT de chacune des sous-unités ainsi que la région riche en cystéines à l'interface des segments transmembranaires et du VFT. Lors de l'activation du CaSR la distance entre la partie intracellulaire C terminale est réduite et il y a un réarrangement potentiel des segments transmembranaires (Figure 25) ([Ling et al., 2021](#)).



**Figure 25 :** Mécanisme d'ouverture du CaSR. Après avoir lié le L-tryptophane, le VFT se ferme, puis le  $\text{Ca}^{2+}$  se lie et engendre un changement de conformation l'activant. LB1 et LB2 sont les deux domaines composant le VFT ; TMD pour les segments transmembranaires et CRD pour la région riche en cystéines. (Ling et al., 2021)

L'activation du CaSR suit le même schéma d'activation que tous les autres RCPG de la classe C (Chun, Zhang et Liu, 2012). D'abord l'agoniste se lie au récepteur, puis le VFT change de conformation. Ensuite la partie proximale du VFT va interagir avec la région riche en cystéine (Figure 25). Finalement, les parties extracellulaires proches de la membrane de chaque sous-unité vont se rapprocher l'une de l'autre, ce qui s'accompagne certainement d'un réarrangement des segments transmembranaires (Chun, Zhang et Liu, 2012).

La partie intracellulaire intervient dans le contrôle des voies de signalisation intracellulaires que peut initier le CaSR. Pour tous les RCPG de la classe C, cette région détermine la sélectivité de signalisation du récepteur en étant associée à différentes protéines G effectrices (Chun, Zhang et Liu, 2012). Le CaSR est généralement couplé à  $G_{q/11}$ ,  $G_{i/o}$  ou  $G_{12/13}$  (Figure 26) (Hannan et al., 2019).

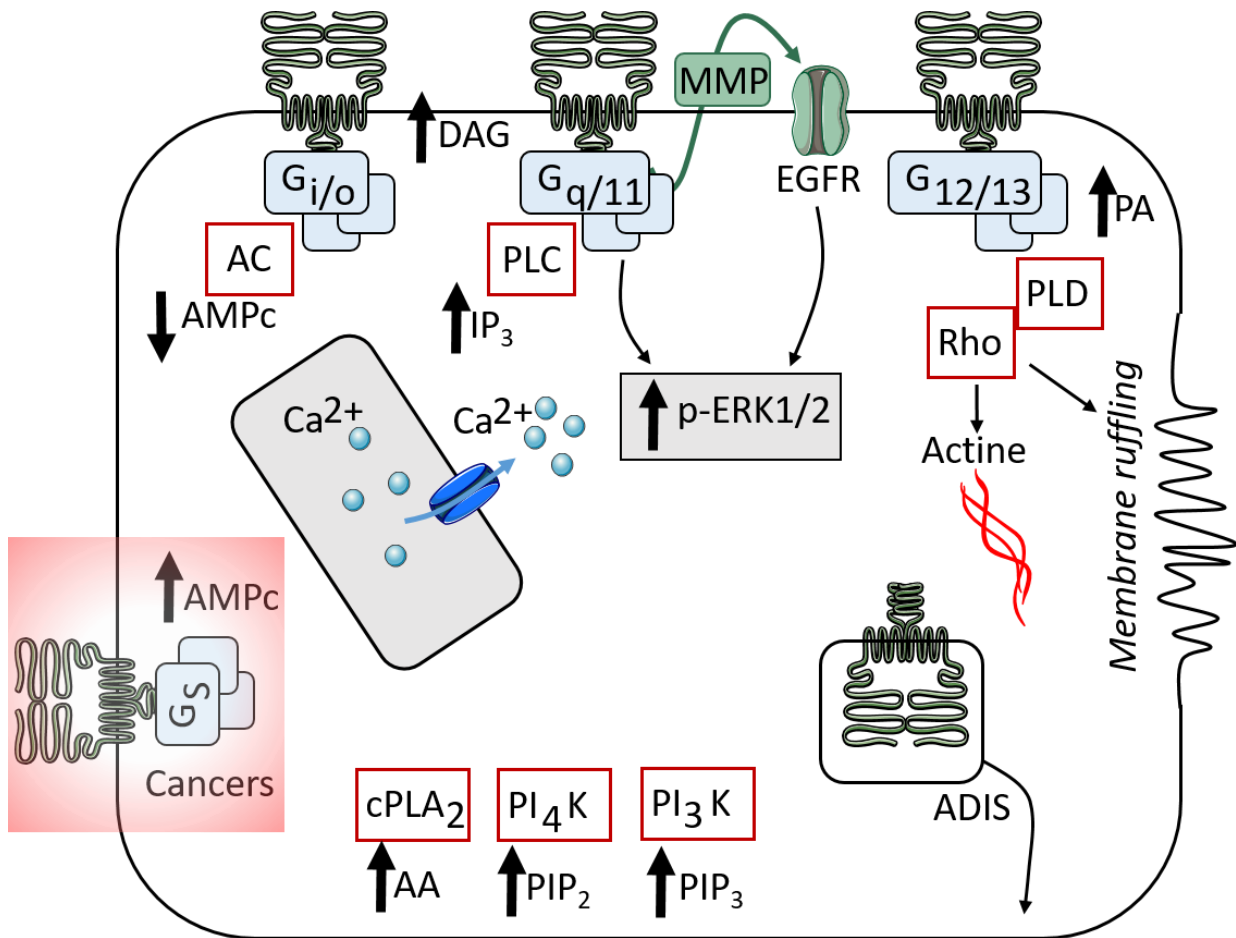
Lorsque le couplage se fait avec  $G_{q/11}$ , la phospholipase C (PLC) va convertir le phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate en diacylglycérole (DAG) et en inositol-1,4,5-triphosphate ( $\text{IP}_3$ ) (Figure 26). Plusieurs résidus intracellulaires sont primordiaux pour l'activation de la phospholipase C : deux acides aminés (Phe-706 et Leu-703) présents sur la boucle intracellulaire

deux, huit acides aminés présents sur la boucle trois. Des sites de phosphorylation sont également présents, permettant d'inhiber le CaSR (Hannan et al., 2019). Lorsque ces sites sont déphosphorylés le récepteur est de nouveau actif. L'IP<sub>3</sub> va pouvoir agir sur des canaux membranaires et ainsi réguler l'influx ou l'efflux de Ca<sup>2+</sup>. L'IP<sub>3</sub> va pouvoir se lier à son récepteur (IP<sub>3</sub>R) présent sur le réticulum plasmique (Woll et Van Petegem, 2022). L'activation de l'IP<sub>3</sub>R est fonction de la concentration cytoplasmique et réticulaire en calcium. Si la concentration cytosolique est forte, le récepteur va être inhibé, si elle est faible, il va être potentialisé (Woll et Van Petegem, 2022). L'augmentation de Ca<sup>2+</sup> intracellulaire, associée au DAG va activer Ras, la voie des MAPs kinases et c-Jun (JNK), tous trois impliqués dans l'initiation de divers processus cellulaires (Hannan et al., 2019).

Lorsque le CaSR est couplé à G<sub>i/o</sub>, il va interagir et inhiber l'adénylate cyclase, diminuant ainsi la production d'AMP cyclique (Figure 26). En fonction du ligand et de l'environnement extracellulaire (pH, concentrations ioniques...) il va activer des facteurs de transcription comme par exemple NF-κB (Hannan et al., 2019).

Il peut également coupler à G<sub>12/13</sub> qui va activer l'adénylate cyclase 7 et ne va plus inhiber la production d'AMP cyclique (AMPC) mais la stimuler.

Dans de rares conditions, notamment dans les cellules cancéreuses, ce récepteur peut également être couplé à G<sub>s</sub> (Mamillapalli et al., 2008) ce qui engendre l'effet opposé d'un couplage G<sub>i/o</sub> (Figure 26). Par exemple dans la glande parathyroïde, l'activation du CaSR va stimuler la sécrétion d'hormone parathyroïdienne au lieu de l'inhiber.



*Figure 26 : Voies intracellulaires du CaSR. En fonction de la cellule et de son environnement, le CaSR peut être couplé à différentes protéines G effectrices.  $G_{i/o}$  qui va coupler à l'adénylate cyclase (AC) et diminuer l'AMP cyclique (AMPc) intracellulaire.  $G_{q/11}$  va coupler à la phospholipase C (PLC). Cela va augmenter le diacylglycérol (DAG) et l'inositol-1,4,5-triphosphate ( $IP_3$ ) intracellulaire.  $G_{12/13}$  va activer sur la phospholipase D (PLD) et Rho qui vont agir sur le cytosquelette (actine, membrane ruffling). Dans de rares cas, comme par exemple lors de cancer, le CaSR va être couplé à  $G_s$  et augmenter l'AMPc intracellulaire. Modifié de Conigrave et Ward, 2013.*

Bien qu'historiquement ce récepteur ait été décrit comme étant activable par le calcium extracellulaire, on sait de nos jours qu'il va être activé ou modulé par un grand nombre d'ions di- ou trivalents et de polyamines cationiques. De plus, son étude a permis de développer plusieurs

modulateurs à haute affinité, dont certains sont utilisés pour traiter les dérèglements de la glande parathyroïde.

### III.3.2 Pharmacologie du CaSR

Le ligand «naturel» du CaSR est le calcium extracellulaire pour lequel le récepteur possède un  $EC_{50}$  de  $4.0 \pm 0,1$  mM (Pearce et al., 1996).

Le CaSR peut être modulé par une variété de ligands endogènes et exogènes. Il existe deux types de modulateurs, les modulateurs orthostériques qui vont se lier au site actif, et les modulateurs allostériques qui vont se lier ailleurs que sur le site actif (Tableau 10).

#### III.3.2.1 Modulateurs orthostériques

Les modulateurs orthostériques vont se lier au site actif et vont pouvoir activer le récepteur, même en absence de calcium extracellulaire. Les affinités pour les cations sont :  $Gd^{3+} > La^{3+} > Ca^{2+} = Ba^{2+} > Sr^{2+} > Mr^{2+}$  (Tableau 10) (Handlogten et al., 2000). Le  $Gd^{3+}$  a un  $EC_{50}$  de  $47 \mu M$  (Pearce et al., 1996). Parmi mes modulateurs orthostériques on trouve également des polyamines cationiques, comme par exemple la poly-L-lysine, poly-L-arginine, poly-L-ornithine (Quinn et al., 1997), des antibiotiques comme la néomycine (Ward, McLarnon et Riccardi, 2002). Finalement, des polyamines endogènes comme la spermine, la spermidine ou la putrescine vont également activer ce récepteur (Tableau 10) (Chang et Shoback, 2004).

#### III.3.2.2 Modulateurs allostériques

Les modulateurs allostériques ne vont pas se lier au site actif. Le calcium ou un autre agoniste orthostérique est nécessaire en plus du modulateur allostérique pour activer le récepteur. Ces modulateurs vont modifier l'affinité du récepteur pour le calcium extracellulaire. Ils vont déplacer l'équilibre, soit vers la forme active, c'est le cas des modulateurs allostériques positifs, soit vers la forme inactive, c'est le cas des modulateurs allostériques négatifs. Certains de ces modulateurs, positifs ou négatifs sont des molécules organiques comme le glutathion, les acides aminés aromatiques, d'autres sont synthétiques (Tableau 10) (Ward et Riccardi, 2012).

Les acides aminés de la série L (L-Trp = L-Phe > L-His > L-Ala > L-Glu > L-Arg = L-Leu) augmentent l'affinité du récepteur pour le  $Ca^{2+}$  ou le  $Gd^{3+}$ . Ce sont les premiers modulateurs allostériques positifs décrits pour ce récepteur. Présents dans l'organisme de façon ubiquitaire, ces acides

aminés sont des régulateurs physiologiques de la signalisation du CaSR comme l'a montré Conigrave et al., en 2004, lors d'une étude sur la sécrétion de parathormone (Conigrave et al., 2004).

Le pH va également moduler le CaSR. Lorsque le pH augmente (>7,5) la sensibilité du récepteur au calcium augmente, lorsque le pH est faible (<7.3) elle diminue (Quinn, Bai et Brown, 2004). Cette inhibition pH dépendante a été démontrée *in vivo*. Une légère diminution du pH va inhiber la mobilisation du calcium intracellulaire suite à l'activation du CaSR (Campion et al., 2015). D'autres travaux suggèrent que les protons ou le Na<sup>+</sup> vont agir comme modulateurs allostériques négatifs sur le CaSR (Bandyopadhyay, Tfelt-Hansen et Chattopadhyay, 2010).

Plusieurs équipes, ont, durant ces vingt dernières années, développé plusieurs composés synthétiques pouvant moduler le CaSR. Les chercheurs du NPS Pharmaceuticals Inc. ont développé plusieurs molécules calcimimétiques, qui vont moduler positivement le CaSR (Tableau 10). Ces composés, le NPS 467 et le NPS 568, vont stabiliser la conformation activée du récepteur en se liant aux régions transmembranaires (Nemeth et al., 1998). Le NPS-568 (ou NPS-R568) a été le précurseur du cinacalcet, dont la biodisponibilité est meilleure. Il est utilisé en clinique pour diminuer le taux de parathormone en augmentant la sensibilité du CaSR au calcium extracellulaire. D'autres calcimimétiques existent comme par exemple le Parsabiv (Etelcalcetide), le Calindo (AC265347) et le Velcalcetide (AMG416) et sont utilisés en recherche ou en clinique (Tableau 10).

Malheureusement, comme le CaSR est exprimé dans tout l'organisme, l'action de ces drogues va également se faire dans d'autres organes et ces médicaments sont associés à des effets indésirables tels que des troubles intestinaux, une hypocalcémie, des nausées... (Steddon et Cunningham, 2005) (Nemeth et Goodman, 2016).

Les drogues calcilytiques produisent l'effet opposé des calcimimétiques. Plusieurs composés ont été décrits (Tableau 10), comme le NPS-2143 ou le NPS-89636 (Nemeth, 2002). le Ronacaleret et le ATF936 vont se lier au niveau des segments transmembranaires et diminuer l'affinité du récepteur pour le calcium (Nemeth et al., 2001). Ces composés sont généralement donnés pour stimuler la sécrétion de parathormone, mais d'autres applications thérapeutiques sont en cours



d'étude comme le traitement de l'asthme ou d'autres maladies respiratoires (Lembrechts et al., 2013).

Agonistes Orthostériques	
Cations	Hautes affinités: $Gd^{3+}$ , $Eu^{3+}$ , $Tb^{3+}$ Moyennes affinités: $Zn^{2+}$ , $Ni^{2+}$ , $Cd^{2+}$ , $Pb^{2+}$ , $Co^{2+}$ , $Fe^{2+}$ Basses affinités: $Ca^{2+}$ , $Mg^{2+}$ , $Ba^{2+}$ , $Sr^{2+}$ , $Mn^{2+}$
Polyamines	Spermine, spermidine, putrescine
Antibiotiques aminoglycosidés	Néomycine, Kanamycine, Gentamycine, Tobramycine...
Polypeptides basiques	Poly-L-lysine, poly-L-arginine, peptides $\beta$ amyloïdes
Modulateurs allostériques	
Acides aminés L	Phenylalaline, Tryptophane, Tyrosine, Histidine
Analogues Gluthathion	$\gamma$ -glutamyl-tripeptides: glutathion, S-méthylglutathion, S-propylglutathion
Calcimimétiques	NPS R-568, NPS R-467, AMG 073, AMG 416 Cinacalcet Dibenzylamine calcimimétique, R,R-cacimimétique B, AC-265347
Calcilytiques	NPS 2143, Calhex 231, ATF396, AXT914, Ronacaleret NPSP795, SB-423557, SB-423562

*Tableau 10 : Différents agonistes orthostériques et modulateurs allostériques du CaSR. Colella et al. 2016*

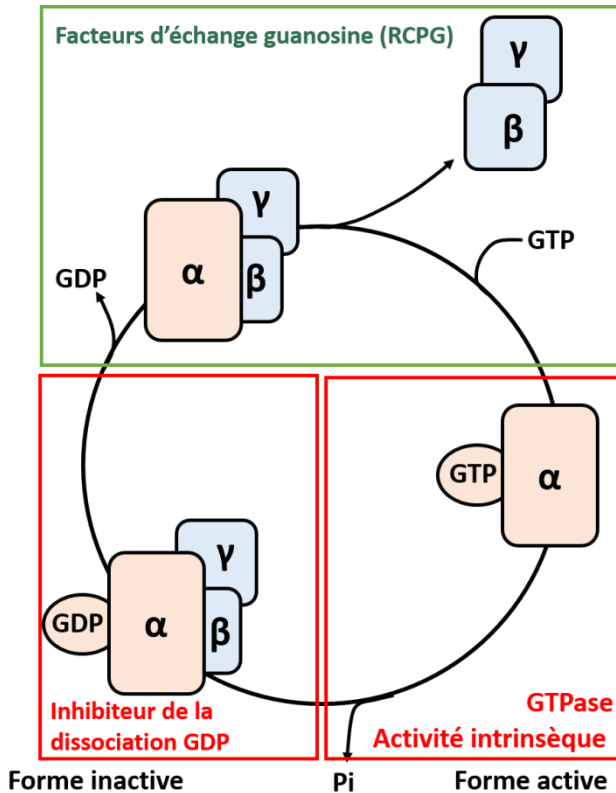
### III.3.3 Voies de transductions intracellulaires

#### III.3.3.1 Introduction sur les protéines G

Les protéines G hétérotrimériques sont composées de 3 sous-unités,  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  (Figure 27) (Spiegel, 1987). Ces protéines sont activées par les RCPGs, comme par exemple le CaSR, qui ont une fonction de facteur d'échange de guanosine. Après activation du RCPG, le GDP présent sur la sous unité  $\alpha$  est remplacé par du GTP et le complexe moléculaire va se dissocier. La sous unité  $\alpha$  liée au GTP et le dimère formé des sous unités  $\beta$  et  $\gamma$  peuvent activer différentes voies intracellulaires (Figure 27) (Spiegel, 1987).

Leur signalisation intracellulaire va se faire jusqu'à ce que le GTP soit hydrolysé en GDP et phosphate inorganique ( $P_i$ ). Après hydrolyse, la forme hétérotrimérique, inactive va se reformer (Figure 27) (Spiegel, 1987).

L'équilibre entre la forme inactive, liée au GDP, et la forme active, liée au GTP, est permis par l'action de trois molécules. Les facteurs d'échange de guanosine qui vont échanger le GDP par du GTP et activer la protéine G, sont assurés RCPGs. L'activité catalytique intrinsèque de la sous unité  $\alpha$  va hydrolyser le GTP en GDP. Les petites GTPases monomériques peuvent accélérer l'activité catalytique de la protéine G, permettant un retour plus rapide à la forme hétérotrimérique inactive. Enfin, il existe aussi des inhibiteurs de la dissociation du GDP, inhibant ainsi l'activité des RCPGs (Figure 27) (Spiegel, 1987).



**Figure 27 : Protéines G hétérotrimériques**

Ces protéines sont activées par les RCPG remplissant la fonction de facteur d'échange guanosine et sont constituées de trois sous unités  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ . Lors de l'activation du RCPG, le GDP va être remplacé par du GTP. La sous unité  $\alpha$  liée au GTP ainsi que le complexe  $G\beta\gamma$  va pouvoir activer différentes voies intracellulaires. L'activité intrinsèque de la sous unité  $\alpha$  ou alors des GTPases va hydrolyser le GTP en GDP et le complexe hétérotrimérique inactif va se reformer.

Comme la plupart des RCPG, le CaSR va pouvoir se lier à différentes protéines G hétérotrimériques, préférentiellement à  $G_{q/11}$  et  $G_{i/o}$  mais également  $G_{12/13}$  et  $G_s$  dans les cellules cancéreuses (lignées et *in vivo*) (Conigrave et Ward, 2013).

### III.3.3.2 Les protéines $G_{q/11}$

La sous unité  $\alpha$  de la protéine G active la phospholipase C $\beta$  (PLC $\beta$ ), qui clive le phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP $_2$ ) localisé à la membrane plasmique en 1,2-diacylglycerol (DAG) et inositol 1,4,5-trisphosphate (IP $_3$ ), tous les deux ayant des rôles de seconds messagers (Neves, Ram et Iyengar, 2002). L'IP $_3$  se fixe sur les récepteurs à l'IP $_3$  localisé sur le réticulum endoplasmique et augmente la concentration de calcium libre dans le cytoplasme. L'IP $_3$  est métabolisée en IP $_2$ , puis IP $_1$ . L'augmentation du calcium cytoplasmique, en association avec les DAGs active la protéine kinase C (PKC) (Neves, Ram et Iyengar, 2002).

La PKC va pouvoir phosphoryler de nombreuses protéines, dont le CaSR au niveau de la tyrosine 888. La phosphorylation de cet acide aminé va réguler l'activité du CaSR (Davies et al., 2007).

L'activation de la PLC inhibe également les adénylate cyclases 5, 6 et 9, indépendamment de l'activité de la protéine  $G_{i/o}$  mais par l'intermédiaire des variations du calcium cytoplasmique. L'inhibition des adénylates cyclases va diminuer l'AMPc cytoplasmique. D'autres voies de signalisation peuvent être sollicitées comme celle de RhoA, mais son importance pour la signalisation du CaSR n'a pas encore été étudiée (Conigrave et Ward, 2013).

#### III.3.3.3 Les protéines $G_{i/o}$

Les protéines  $G_i$  et  $G_o$ , ont des séquences très homologues et des fonctions similaires, cependant  $G_o$  s'exprime préférentiellement dans le SNC et  $G_i$  en périphérie.

L'activation de  $G_{i/o}$  inhibe les adénylates cyclases, et diminue les concentrations cytoplasmiques d'AMPc (Neves, Ram et Iyengar, 2002). Elle intervient également dans la phosphorylation et l'activation d'ERK1/2 (Kifor et al., 2001).

#### III.3.3.4 Les protéines $G_{12/13}$

$G_{12/13}$  active les Rho kinases et phosphoryle le facteur de réponse au sérum (SRF) tous deux impliqués dans les changements morphologiques, la migration cellulaire et la modulation de l'expression génique (Suzuki, Haiicek et Kozasa, 2009). Leur activation va moduler la libération de  $\beta$ -caténine ; l'activation des tyrosine kinases, de phosphatases et celle du facteur d'échange de guanosine Rho (Kozasa et al., 2011).

Elle active également l'adénylate cyclase 7. Donc si  $G_{12/13}$  ou l'adénylate cyclase 7 sont surexprimées, le CaSR ne va plus inhiber la production d'AMP cyclique mais la stimuler. C'est notamment le cas dans les cellules cancéreuses (Conigrave et Ward, 2013).

#### III.3.3.5 La protéine $G_s$

Quelques études montrent que le CaSR peut être associé à  $G_s$ . Mamillapalli et al., ont montré que dans les cellules épithéliales saines le CaSR couple préférentiellement à  $G_i$ . En revanche dans des cellules cancéreuses, il couple à  $G_s$  (Mamillapalli et al., 2008). Dans leur article, ils s'étonnent de n'observer aucune accumulation d' $IP_1$ , alors qu'ils observent une augmentation des MAPs kinases (MAPK). Dans ces cellules la sécrétion parathormone est régulée par l'AMP cyclique *via* la

protéine kinase A (PKA) ( $G_s$  - AMP cyclique – PKA) indépendamment de la PKC ou de la PLC (Mamillapalli et al., 2008).

Le changement de signalisation intracellulaire des RCPGs n'est pas observé que dans le cas du CaSR. Par exemple, dans le cas du récepteur adrénergique  $\beta_2$ , la PKA va phosphoryler le récepteur, augmentant ainsi son affinité pour  $G_i$  au détriment de  $G_s$ . La signalisation intracellulaire va passer de la voie AMPc – PKA à la voie des MAPs kinases (Daaka, Luttrell et Lefkowitz, 1997).

#### III.3.3.6 Les Rho GTPases et les $\beta$ -arrestines

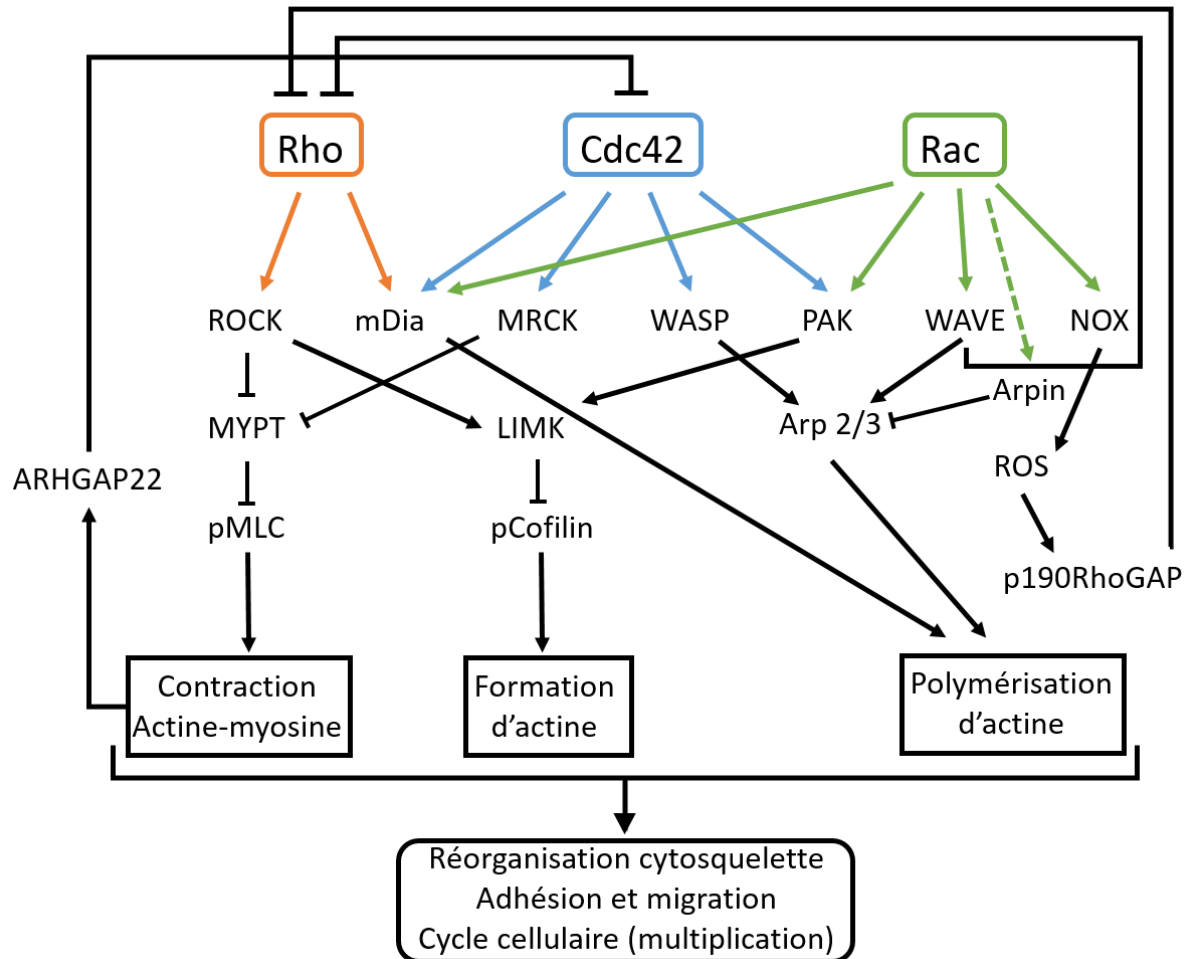
Les Rho GTPase font partie des protéines Ras qui sont des petites protéines G monomériques (Sadok et Marshall, 2014). Les plus étudiées sont RhoA, Rac1 et Cdc42 (Figure 28) qui sont impliquées dans la réorganisation du cytosquelette d'actine, l'adhésion et la migration cellulaires ainsi que dans la progression du cycle cellulaire (Sadok et Marshall, 2014).

L'activation de Rho A est associée à  $G_{12/13}$ , dépendante de la PLC $\beta$ . Rho A peut également être activée indépendamment de la PLC $\beta$ , suite à l'activation de  $G_{q/11}$  et du recrutement du facteur d'échange de guanosine Rho. L'activation du CaSR entraîne une réorganisation des filaments d'actine, dépendant des kinases Rho (Sadok et Marshall, 2014). Egalement impliqué dans l'adhésion entre cellules, l'activation de Rho A par le CaSR se fait grâce à une augmentation du calcium cytosolique, dépendant du canal cationique non sélectif TRPC6 (Zhang et al., 2017).

Rac1 et Cdc42 sont également activées par les protéines G. Dans des macrophages humains, l'activation du CaSR va recruter les petites GTPases Rac1 et Cdc42, mais pas Rho A, pour réguler le «*membrane ruffling*», qui est la formation de protrusions cellulaires mobiles contenant des filaments d'actine nouvellement polymérisés, ainsi que la macropinocytose (Canton et al., 2016). Dans les lymphocytes T, l'activation du CaSR promeut la migration cellulaire par l'action de Cdc42 (Chang et al., 2018). Ces deux phénomènes sont dépendants de la PI<sub>3</sub> kinase.

Les  $\beta$ -arrestines sont primordiales pour arrêter la signalisation intracellulaire par les protéines G (Tian, Kang et Benovic, 2014). La  $\beta$ -arrestine-1 est impliquée dans le «*membrane ruffling*» CaSR

dépendant (Bouschet et al., 2007) et les  $\beta$ -arrestines 1 et 2 sont impliquées dans la signalisation ERK1/2 (Thomsen, Hvidtfeldt et Bräuner-Osborne, 2012).



*Figure 28 : Signalisation des RhoGTPases. L'activation de Rho, Rac ou Cdc42 va induire des modifications du cytosquelette d'actine. Ces modifications induisent des changements morphologiques, de l'adhésion et de la migration cellulaire, ainsi que de la progression du cycle cellulaire (multiplication cellulaire).*

### III.3.3.7 Protéines kinases

Le CaSR active différentes familles de protéines kinases. Les GSK (*glycogen synthase kinase 3*) qui régulent l'addition de phosphate sur les résidus sérine et thréonine de plus de 100 substrats (Beurel, Grieco et Jope, 2015). Les Akt, aussi appelées protéines kinases B (PKB), qui sont

impliquées dans la survie cellulaire en inhibant l'apoptose et la biosynthèse de nouvelles protéines. La famille des MAP kinases qui est indispensable à l'induction de la mitose, est également impliquée dans l'apoptose et la différenciation cellulaire.

#### III.3.3.7.1 Akt et GSK-3

Akt intervient dans la croissance, la prolifération cellulaire mais également dans la régulation de la transcription de gènes (Brazil, Yang et Hemmings, 2004). Son activation se fait en plusieurs étapes, tout d'abord Akt va se lier au PIP<sub>3</sub> membranaire, ensuite les résidus Tyrosine-308 et Sérine-473 sont phosphorylés (Brazil, Yang et Hemmings, 2004).

GSK-3 intervient dans la phosphorylation d'une centaine de substrats cellulaires. Il en existe deux isoformes,  $\alpha$  et  $\beta$ , qui peuvent être phosphorylées. La phosphorylation va permettre leurs interactions préférentielles avec certains substrats. Par exemple lorsque GSK-3 $\beta$  est phosphorylée sur la sérine-9, l'encombrement stérique fait qu'une région n'est plus accessible et donc le substrat ne pourra plus se lier (Beurel, Grieco et Jope, 2015).

#### III.3.3.7.2 Les MAP kinases

Le CaSR peut phosphoryler les MAP kinases ERK, JNK (*c-Jun amino terminal kinase*) et p38 qui sont inactives avant phosphorylation (Pearson et al., 2001).

ERK1/2 peut être activée par la PKC ou par la famille des Ras GTPases. L'activation d'ERK1/2 par la famille des Ras GTPases fait intervenir la PI<sub>3</sub> kinase, quelques kinases de la famille Src et des récepteurs tyrosines kinases, comme le récepteur de l'EGF.

L'activation de ERK1/2 fait débat, certaines études affirment qu'elle est dépendante de Ras (système d'expression hétérologue, cellule HEK293) (Hobson et al., 2003), d'autres du recrutement de tyrosines kinases (système d'expression hétérologue, cellule HEK293 (Kifor et al., 2001) et fibroblastes de rat (McNeil et al., 1998)). Globalement, dans tous les tissus, une expression et une activation accrue de ERK1/2 est synonyme d'une augmentation de la forme phosphorylée, active d'ERK1/2 (pERK1/2). Cette corrélation positive est également retrouvée pour JNK, mais pas pour p-38 ou certaines études décrivent un effet similaire mais d'autres n'observent pas d'effet.

En résumé, lors d'une activation soutenue et prolongée du CaSR, l'ARN messager du CaSR va être augmenté et l'expression protéique également. Bien souvent, ce phénomène est corrélé positivement avec une augmentation de la phosphorylation d'ERK1/2, de JNK et de p-38 induisant leur activation.

#### III.3.4 Biais systémique et biais par le ligand

Le CaSR peut coupler à différentes protéines G et initier des voies de signalisation intracellulaire distinctes. Il peut donc participer à plusieurs processus biologiques en fonction du type cellulaire, des protéines G exprimées, et de la voie de couplage impliquée (Conigrave et Ward, 2013).

La nature des cellules et l'environnement tissulaire jouent un rôle important dans la signalisation des RCPGs. En effet, un RCPG peut avoir différentes propriétés pharmacologiques en fonction de la cellule dans laquelle il est exprimé. Ce phénomène est particulièrement présent lorsqu'on utilise des systèmes d'expressions hétérologues. On parle de biais systémique ou de signalisation tissus-spécifique.

Le CaSR peut interagir avec différentes protéines, former des hétérodimères, de manière tissu spécifique et cela va moduler sa signalisation intracellulaire. Plusieurs protéines partenaires ont été identifiées pour le CaSR, comme les canaux Kir, la filamine A, la dorphin, certains RCPGs de la classe C comme les récepteurs métabotropes du glutamate (mGlu1a, mGlu5) et les récepteurs GABA<sub>B</sub> (Conigrave et Ward, 2013) (Goolam et al., 2022). Ces complexes protéiques sont étudiés dans des systèmes hétérologues et endogènes. Le CaSR peut activer plusieurs protéines G d'une manière tissu spécifique, mais la possibilité de former des complexes protéiques ouvre la voie à de nouveaux mécanismes, de nouvelles voies qui pourraient dépendre de l'environnement cellulaire (Conigrave et Ward, 2013).

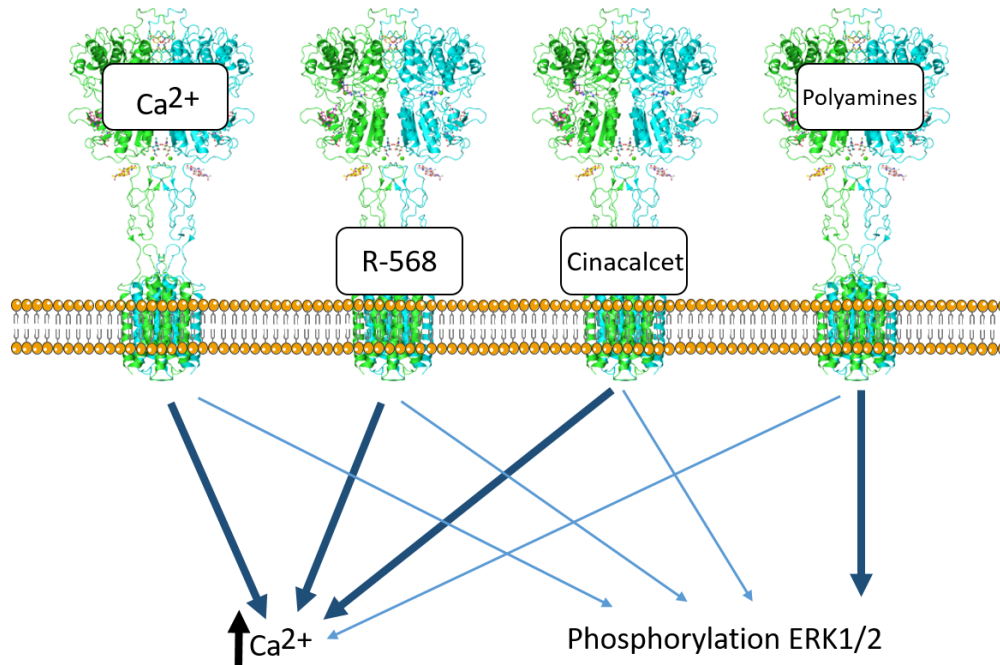
La signalisation biaisée par le ligand est un concept novateur suggérant qu'un récepteur existe dans différents états activés, chacun stabilisé par un ligand spécifique, et aura donc un profil de signalisation distinct (Figure 29) (Smith, Lefkowitz et Rajagopal, 2018). Pour les RCPGs, cela se traduit par différents couplages aux protéines G ou aux  $\beta$ -arrestines en fonction de l'agoniste qui va se lier au récepteur (modulateurs orthostériques). Pour les modulateurs allostériques, cela concerne la modulation positive ou négative des voies de signalisation intracellulaire permise par



un ligand particulier. Ce phénomène est particulièrement intéressant dans le domaine pharmaceutique, car il permet de développer des agents pharmacologiques plus spécifiques, avec moins d'effets secondaires et donc plus sûrs (Smith, Lefkowitz et Rajagopal, 2018).

Le CaSR couple à une multitude de protéines G et présente une pharmacologie très variée. C'est donc le parfait candidat pour l'étude et la compréhension de la signalisation biaisée par le ligand. En fonction de la protéine G activée, plusieurs phénomènes intracellulaires distincts peuvent avoir lieu. Pour  $G_{q/11}$  on peut mesurer la variation du calcium cytoplasmique et l'accumulation d' $IP_1$ , pour  $G_i$  et  $G_s$  la quantité d'AMP cyclique, la phosphorylation d'ERK1/2 et pour  $G_{12/13}$ , qui active l'adénylate cyclase 7, une augmentation de l'AMPc par exemple. De plus l'expression membranaire du récepteur est également évaluée. L'étude des biais se fait *in vitro*, mais a pour vocation la compréhension des effets divergents de certains ligands *in vivo* (Davey et al., 2012).

Par exemple dans l'étude de Davey et al. (2012), les effets de trois modulateurs allostériques du CaSR ont été évalués : les modulateurs allostériques positifs, le cinacalcet et le NPS-R568, et le modulateur allostérique négatif, le NPS-2143. Ils ont évalué la mobilisation du calcium cytoplasmique, la phosphorylation d'ERK1/2 et le « *membrane ruffling* ». Le cinacalcet va augmenter le calcium cytosolique, mais n'a que peu d'effet sur la phosphorylation d'ERK1/2 (Figure 29).



*Figure 29 : Exemple de molécules avec agonisme biaisé. Le  $\text{Ca}^{2+}$ , le R-568 et le cinacalcet vont privilégier l'augmentation du calcium cytoplasmique alors que les polyamines vont privilégier la phosphorylation d'ERK1/2.*

L'une des limites de l'utilisation de ces molécules lors de traitements *in vivo* est l'expression ubiquitaire du CaSR. Développer des ligands qui vont spécifiquement impacter une voie de signalisation permettrait de s'affranchir des effets néfastes que peuvent produire ces drogues dans d'autres organes (Davey et al., 2012).

### III.3.5 CaSR et fonctions immunitaires

Même si le CaSR est exprimé et fonctionnel sur certaines cellules immunitaires, les neutrophiles, les monocytes / macrophages et les lymphocytes T, mais pas les lymphocytes B, ni la microglie, l'étude de son implication dans la réponse inflammatoire reste pauvre et controversée.

Néanmoins, de récentes études suggèrent une implication majeure mais incomprise du CaSR dans différents états pathologiques. Par exemple, il régule la sécrétion de cytokines (Iamartino et Brandi, 2022), l'assemblage de l'inflammasome NLRP3 (Lee et al., 2012). Il est également impliqué dans la chimiotaxie mais il intervient aussi dans le changement phénotypique de certaines cellules

immunitaires périphériques (Iamartino et Brandi, 2022). Il peut donc être une cible de choix pour réguler / intervenir dans le basculement pro-/anti-inflammatoire.

En 2017, Zhai et al., démontrent la présence du CaSR fonctionnel dans les cellules polynucléaires neutrophiles de rat (Zhai et al., 2017), puis Ren et al., l'identifient également dans les cellules polynucléaires neutrophiles d'humains en 2020 (Ren et al., 2020).

L'activation du CaSR exprimé par les polynucléaires neutrophiles diminue la production d'espèces réactives de l'oxygène, de l'IL-10, de l'apoptose cellulaire et augmente la sécrétion d'IL-6 (Zhai et al., 2017). Dans un modèle d'infarctus du myocarde murin, l'expression du CaSR est augmentée dans les cellules neutrophiles qui sécrètent de l'IL-1 $\beta$  après assemblage de l'inflammasome NLRP3 (Ren et al., 2020). L'augmentation de l'expression est dépendante du temps, avec un pic 24h après l'infarctus et une diminution progressive sur les sept jours suivants (Ren et al., 2020). Lorsque ces cellules neutrophiles sont mises en coculture avec des cardiomyocytes ou des fibroblastes cardiaques, l'apoptose des cardiomyocytes augmente mais la différenciation des fibroblastes cardiaques en cardiomyocytes sains augmente également (Ren et al., 2020). Le CaSR active donc les polynucléaires neutrophiles et stimule la réparation tissulaire après un infarctus du myocarde (Ren et al., 2020). Même si ces données semblent prometteuses, très peu d'études ont évalué l'implication du CaSR dans des affections telles que l'infarctus du myocarde, ce qui est regrettable car des agonistes et antagonistes existent et sont déjà utilisés pour traiter d'autres pathologies périphériques telles que l'hypo- ou l'hyperparathyroïdie.

Les macrophages périphériques jouent un rôle clé dans le maintien de l'homéostasie et la défense contre les pathogènes. Une augmentation de calcium extracellulaire a un effet attracteur sur ces cellules. L'effet est médié, au moins en partie, par le CaSR et la voie IP<sub>3</sub> kinase-Akt (Boudot et al., 2010). De même, pour les monocytes, l'activation du CaSR favorise la chimiotaxie. Un KO de celui-ci perturbe la chimiotaxie médiée par le calcium extracellulaire. Ces données suggèrent une synergie entre le CaSR et les chimiokines dans le recrutement des cellules immunitaires (Olszak et al., 2000). La macropinocytose, nécessaire à la capture des antigènes par les cellules présentatrices d'antigènes, peut également être amplifiée après stimulation du CaSR (Canton et al., 2016).

L'augmentation de l'expression sur les monocytes ou les macrophages est souvent associée à une pathologie (maladie artérielle, polyarthrite rhumatoïde, infarctus du myocarde, trouble métabolite liés à l'obésité, arthrose...). L'expression du CaSR monocytaire est augmentée de 50 % chez des patients atteints d'obésité, et l'augmentation de l'expression est corrélée positivement avec l'intensité de la maladie (Malecki et al., 2013). Une autre étude montre des résultats similaires pour une cohorte atteinte de polyarthrite rhumatoïde (Paccou et al., 2014). A défaut d'être la cible de traitement pour ces pathologies, l'augmentation du CaSR sur les monocytes peut être un bon indicateur de l'évolution d'une affection chez l'humain (facilement accessible par prise de sang).

Le syndrome périodique associé à la cryopyrine (CAPS), est une maladie auto-inflammatoire caractérisée par des épisodes inflammatoires récurrents, en l'absence de maladie auto-immune ou d'infection. Elle est due à une mutation du gène codant pour l'inflammasome NLRP3 (Welzel et Kuemmerle-Deschner, 2021).

L'augmentation de calcium cytoplasmique est nécessaire à l'assemblage de l'inflammasome NLRP3 et l'AMP cyclique inhibe cet assemblage. Le CaSR peut activer l'inflammasome NLRP3, en augmentant le calcium cytoplasmique et en inhibant la production d'AMP cyclique (Lee et al., 2012). Chez les patients souffrant du CAPS, la mutation empêche la bonne inhibition de l'assemblage par l'AMP cyclique qui ne peut pas se lier. Le calcium cytosolique et la production d'AMP cyclique sont tous deux des régulateurs moléculaires de l'assemblage de l'inflammasome NLRP3. Cela fait du CaSR une cible de choix pour inhiber l'assemblage de l'inflammasome NLRP3 et limiter les phénomènes inflammatoires (Lee et al., 2012).

D'Espessailles et al., ont étudié l'activation des macrophages (THP-1 monocytes différenciés en macrophages) par le CaSR et son implication dans l'obésité et les troubles qui peuvent y être associés (D'Espessailles et al., 2020). En effet, l'obésité est un problème de santé publique, elle conduit à des pathologies tel que le diabète de type 2, certains cancers et des maladies cardiovasculaires. Ces affections sont associées à une inflammation du tissu adipeux qui est médié par les macrophages ou par les cellules adipeuses elles même.

Après activation du CaSR exprimé par les macrophages, les adipocytes (ligné LS14, dérivée d'un liposarcome métastatique humain) exposés au surnageant des macrophages, sécrètent des molécules pro inflammatoires. De même, les macrophages stimulés avec du cinacalcet, un agoniste du CaSR, sécrètent des cytokines pro inflammatoires, expriment l'inflammasome NLRP3, la pro-IL-1 $\beta$  et l'activité de la caspase-1 est augmentée. L'incubation avec un antagoniste du CaSR bloque ces effets (D'Espessailles et al., 2018). Les auteurs suggèrent que l'activation et l'augmentation de l'expression du CaSR sur les macrophages n'engendre pas seulement une augmentation du phénotype pro inflammatoire de ces cellules, mais va également stimuler l'activité inflammatoire des adipocytes, par des voies paracrines (D'Espessailles et al., 2018). Bien que ces résultats semblent prometteurs et encourageants pour la prise en charge des maladies liées à l'obésité, ils ont été obtenus dans une lignée de cellules cancéreuses. Il a été démontré que les cellules cancéreuses ont une signalisation particulière, et que le CaSR va préférentiellement être couplé à G<sub>s</sub> (Mamillapalli et Wysolmerski, 2010), il se peut donc que leurs conclusions soient erronées, que la surexpression et l'activation du CaSR soient bénéfiques et non néfastes.

Il est donc évident que le CaSR joue un rôle dans l'initiation, le maintien et la résorption de l'inflammation périphérique en agissant directement sur le CaSR exprimé par les cellules immunitaires ou sur les cellules impactées par la pathologie. Cependant, présentant un biais tissulaire et moléculaire, chaque organe présente des spécificités quant aux voies intracellulaires initiées par l'activation du CaSR, qui, en plus, peuvent être modulés par différents agonistes. De plus, en conditions pathologiques, le CaSR va être couplé à différentes protéines G, comme c'est notamment le cas dans les cellules cancéreuses (G<sub>s</sub> et non G<sub>i</sub>).

Le CaSR est également présent dans le SNC. Exprimé par les neurones, les astrocytes et les oligodendrocytes, il participe activement à diverses fonctions comme la différenciation cellulaire dans le système nerveux en développement ou la neurotransmission et la plasticité neuronale dans le SNC adulte. Les fonctions spécifiques à chaque type cellulaire sont résumées dans le tableau 11. Actuellement l'étude du CaSR dans le SNC est orientée principalement vers le neurodéveloppement et les données disponibles quant à ses fonctions dans le SNC adulte restent limitées.

	Modèle	Rôle du CaSR déduit
Neurones	Ganglion cervical (neurones sympathique)	Croissance axonale et dendrites, par activation ERK1/2
	Lignée cellulaire GnRH (GN11 et GTI-7)	Migration neuronale, chimiotaxie (sécrétion MCP-1), Survie neuronale
	Précurseur de cellules en granulaire (cervelet)	Migration cellulaire par la voie MAPK
	Neurones de souris double KO CaSR	Croissances neurites
Oligodendrocytes	Oligodendrocytes de souris KO CaSR (NSC)	Développement des oligodendrocytes
	Oligodendrocytes de rat (NSC)	Différenciation et prolifération Ouverture de canal K <sup>+</sup> activé par le Ca <sup>2+</sup>
	Oligodendrocytes de rat (20 jours post natal)	Mobilisation Ca <sup>2+</sup> et IP intracellulaire (PLC dépendant)
Astrocytes	Lignée U373 (astrocytome)	Prolifération, active canal cationique non sélectif
	Lignée U87 (astrocytome)	Stimule l'ouverture d'un canal K <sup>+</sup> sortant

*Tableau 11 : Fonctions du CaSR dans le système nerveux central, en fonction du type cellulaire.*

Le maintien de l'homéostasie du calcium est crucial pour un bon fonctionnement du SNC. Lorsque les niveaux de calcium extracellulaire sont dérégulés plusieurs processus pathologiques peuvent se mettre en place, allant du vieillissement cérébral à des affections plus sévères comme des lésions neuronales dues à une excitotoxicité (Foster, 2007).

Plusieurs études se sont intéressées à l'implication du CaSR dans les pathologies du SNC. Le CaSR joue un rôle dans les maladies neurodégénératives, les tumeurs cérébrales et sa modulation pharmacologique représente une piste prometteuse pour limiter le développement et la propagation de ces pathologies, voire même leurs rémissions, si la prise en charge se fait suffisamment tôt.

Lors d'une ischémie cérébrale, il y a une interruption/diminution de l'irrigation sanguine, causant une diminution de l'apport d'oxygène et de nutriments. De plus l'évacuation des déchets métaboliques sera aussi impactée (Kalogeris et al., 2012). Lors d'une ischémie cérébrale chez le rat, l'expression du CaSR est augmentée, d'abord dans les neurones et les cellules associées aux capillaires (péricytes, cellules endothéliale) proches du site ischémique, puis dans les astrocytes réactifs présents en bordure de la zone lésée (cicatrice gliale) (Noh et al., 2015). De même, les astrocytes en culture sont activés par une privation d'oxygène et de glucose et présentent une augmentation de l'expression du CaSR (Pak et al., 2016). Dans ces études, des comarquages du CaSR et d'Iba-1 (un marqueur microgliale) sur tranche de cerveau, ont conclu à l'absence d'une expression microgliale du CaSR (Pak et al., 2016). Ces données suggèrent l'implication du CaSR dans la réaction astrocytaire après ischémie cérébrale (Noh et al., 2015)(Pak et al., 2016). Lors d'une hypoxie cérébrale, des résultats similaires sont obtenus (Wang et al., 2015). Les conséquences de l'ischémie cérébrale et de l'hypoxie sont amplifiées par l'activation du CaSR, notamment par l'intermédiaire des voies ERK1/2 et PLC. Les drogues calcilytiques seraient donc une bonne approche pour prendre en charge ces pathologies.

La maladie d'Alzheimer est une maladie neurodégénérative qui touche près de 50 millions de personnes dans le monde. La maladie s'aggrave avec l'accumulation extracellulaire de protéine amyloïde A $\beta$  qui va former des plaques séniles et augmenter les agrégations intracellulaires de protéine Tau (Hardy et Selkoe, 2002) (Spires-Jones et Hyman, 2014). Depuis l'hypothèse de la cascade amyloïde, la communauté scientifique considère la protéine amyloïde A $\beta$  comme déclencheur de la maladie et des phénomènes neurotoxiques qui en découlent (Hardy et Selkoe, 2002). On sait maintenant que cette pathologie est multifactorielle, avec plusieurs cibles moléculaires et processus cellulaires impliqués (Gong, lui et Iqbal, 2018). Une dérégulation du calcium extracellulaire joue un rôle clé dans cette pathologie. L'activation de la voie

amyloïdogénique va modifier la signalisation neuronale. Les signaux dépendants du calcium vont être altérés, comme l'apprentissage et la mémoire ; tous deux représentant des symptômes typiques de la maladie d'Alzheimer. L'influx de calcium dans le neurone va être augmenté, par l'activation des récepteurs NMDA par la protéine amyloïde A $\beta$  extracellulaire mais également par une libération de calcium à partir des stocks intracellulaires (Berridge, 2010). L'augmentation aberrante du calcium cytoplasmique va, en plus des problèmes d'apprentissage et de mémoire, engendrer des dysfonctionnements neuronaux et une neurodégénérescence médiée par l'apoptose calcium dépendante (Green et LaFerla, 2008). Lorsqu'on expose des astrocytes et des neurones à de l'amyloïde fibrillaire (A $\beta_{25-35}$ ), ils sécrètent de l'amyloïde A $\beta_{42}$ , cette sécrétion est bloquée par le NPS-2143, un modulateur allostérique négatif du CaSR. De plus, l'expression membranaire du CaSR diminue après traitement avec le NPS-2143. Cette diminution d'expression membranaire empêche la propagation par auto-induction de l'amyloïde A $\beta_{42}$  (Armato et al., 2013). L'application d'un agoniste du CaSR, le NPS-R568, reproduit les effets de l'amyloïde A $\beta_{42}$  extracellulaire (Armato et al., 2013).

Les neuroblastomes sont des tumeurs du système nerveux, survenant chez le jeune enfant et représentent 7 à 10 % de toutes les tumeurs observables chez le jeune enfant (Luksch et al., 2016). Une corrélation positive entre l'expression de l'ARN messager du CaSR et la survie a été montrée (de Torres et al., 2009). La transfection du CaSR dans les cellules d'une lignée de neuroblastome diminue la prolifération cellulaire, augmente la phosphorylation de ERK1/2 et engendre l'apoptose, après application de calcium extracellulaire (Casalà et al., 2013). Ces observations vont dans le même sens que l'effet de l'activation de ce récepteur dans l'ischémie ou l'hypoxie (Noh et al., 2015). En accord avec ces résultats, une étude sur l'action du cinacalcet sur des neuroblastomes montre une diminution de la prolifération cellulaire en favorisant la différenciation cellulaire et l'apoptose. Les auteurs montrent également une surexpression du CaSR lorsque les cellules sont traitées avec le cinacalcet, alors que l'expression basale dans ces cellules est très faible. L'avantage du traitement est double : réduction de l'agressivité du neuroblastome et potentialisation du traitement avec des drogues calcimimétiques (Rodríguez-Hernández et al., 2016).



Depuis la caractérisation du CaSR dans le système nerveux central (et périphérique), il est maintenant clair qu'il intervient dans des processus physiologiques tels que le développement et la différenciation des neurones, des oligodendrocytes et des astrocytes. De plus à l'âge adulte, sa présence est nécessaire au bon fonctionnement du SNC ([Bandyopadhyay, Tfelt-Hansen et Chattopadhyay, 2010](#)). Même si on dispose d'une palette de molécules capables de moduler le CaSR, très peu d'entre elles passent la BHE et donc leur utilisation pour traiter les pathologies du SNC est limitée. Pourtant, l'utilisation de drogues calcimimétiques ou calcilytiques permettrait d'envisager une contribution à la prise en charge thérapeutique de différentes pathologies.

Malheureusement, très peu d'études pharmacologiques s'intéressent au passage de la BHE par ces molécules, car initialement créées pour des traitements périphériques. Néanmoins, depuis quelques années, de plus en plus d'équipes ciblent les RCPG du système nerveux central pour prendre en charge diverses pathologies ([Lim, 2007](#)). Le biais systémique et le biais du ligand sont deux pistes prometteuses pour réussir à développer des médicaments qui ne vont cibler qu'une seule voie intracellulaire et donc limiter les effets indésirables que peut produire un traitement qui va activer l'ensemble des voies intracellulaires du CaSR.

Finalement, le CaSR est décrit dans les cellules immunitaires périphériques, mais sa caractérisation, ou non, sur les cellules immunitaires du SNC reste encore à faire. Certaines cellules qui participent activement aux phénomènes neuroinflammatoires l'expriment et il est modulé en cas de dérèglement, c'est notamment le cas des astrocytes ou son expression augmente en cas d'activation astrocytaire ([Pak et al., 2016](#)).

## IV. Objectifs du travail de thèse

Notre objectif global était de caractériser les changements morphologiques et fonctionnels qui accompagnent et/ou sous-tendent « l'activation » des cellules microgliales. Ces phénomènes ont été étudiés dans une lignée murine de cellules microgliales (cellules BV-2) en culture afin de maîtriser parfaitement l'environnement cellulaire du point de vue de sa composition chimique et de pouvoir appliquer des molécules d'intérêt à des concentrations et pour des durées connues. L'induction d'un phénotype pro-inflammatoire peut être induit dans ces cultures par l'exposition à du LPS (lipopolysaccharide de paroi de bactéries Gram moins) et un phénotype anti-inflammatoire est obtenu par application d'interleukine 4 (IL-4).

Dans ce contexte nous nous sommes également demandé s'il était possible d'identifier des éléments de signalisation (récepteurs membranaires, messagers intracellulaire) pouvant contrôler la conversion entre les états pro- et anti-inflammatoires.

Notre projet était divisé en 3 volets :

1) Mettre au point un système de culture reproductible de cellules BV-2 afin de pouvoir quantifier les changements morphologiques induits par les stimuli pro- et anti-inflammatoires et permettant d'identifier des récepteurs et voies de signalisation induisant ces changements morphologiques.

2) Caractériser les récepteurs-canaux de l'ATP (P2X) exprimés par les cellules BV-2 en condition « contrôle » et après inductions des phénotypes pro- ou anti-inflammatoires. En effet, l'ATP est une molécule de signalisation extracellulaire importante. Des concentrations faibles d'ATP sont anti-inflammatoires alors que des concentrations très fortes d'ATP sont pro-inflammatoires.

3) Caractériser plus en détail le rôle des récepteurs P2X7 qui sont activés par des concentrations très élevées d'ATP et qui induisent un phénotype pro-inflammatoire et induisent l'apoptose. Ces récepteurs sont également impliqués dans le maintien des états neuroinflammatoires observés

dans de nombreuses pathologies neurodégénératives du système nerveux central ainsi qu'à l'induction et au maintien de douleurs neuropathiques. Nous voulions en particulier déterminer si le canal anionique anoctamine 6 (ANO6, TMEM16F) était un partenaire de P2X7 permettant (1) la libération de molécules anioniques (telles que l'ATP) et (2) de remodeler la composition lipidique de la membrane plasmique par l'activité scramblase intrinsèque à ANO6. Ceci a nécessité la construction de mutants du récepteur P2X7 et de mettre au point un système de détection de l'activation d'ANO6 par P2X7.

### **Information importante concernant le contenu de ce manuscrit de thèse**

**Les deux premiers objectifs ont été atteints et font l'objet de ce manuscrit de thèse. Pour ce qui est du 3eme objectif, les mutations (par mutagenèse dirigée, troncation et insertions de larges séquences (LOV-2)) de P2X7 ont été réalisées et leurs caractéristiques sont présentées dans l'Annexe 1 de ce manuscrit. Les tests fonctionnels sont en cours et ont pris du retard notamment car il est très difficile de détecter l'activation d'ANO6 puisqu'il n'existe pas de bloquants spécifiques de ce canal. Ce point nécessite par conséquent de comparer les résultats obtenus sur des cellules « contrôle » et des cellules dont le gène de ANO6 a été inactivé, ce qui est assez laborieux et chronophage au plan pratique.**

## V. Matériels et Méthodes

### V.1 Substances pharmacologiques

Substance	Référence	Solvant	Concentration solution Stock
ATP	Sigma A9187	eau	10 mM
Bz-ATP	Abcam 120 444	eau	10 mM
$\alpha\beta$ -Met-ATP	Tocris 3209	eau	10 mM
GTP	Sigma 10106399001	eau	25 mM
UTP	Sigma 94370	eau	20 mM
TNP-ATP	Tocris 2464		10 mM
5-BDBD	Tocris 3579	DMSO	10 mM
A740003	Tocris 3701	DMSO	1 mM
Ivermectine	Sigma I-8898	DMSO	4 mM
BBG	Sigma B5133		
Suramine	Tocris 1472	eau	10 mM
AZ10606120	Tocris 3323	eau	10 mM
Hexokinase	Sigma H5000		
DPCPX	Sigma C9694	éthanol	2 mM
NF449	Tocris 1391	eau	2 mM
TC-P 262	Tocris 4386	DMSO	10 mM
ADP	Sigma A9187	eau	20 mM

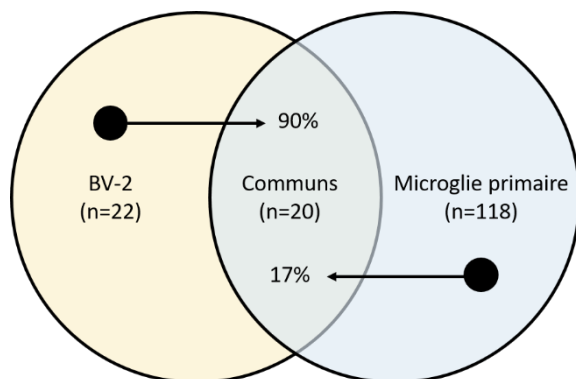
*Tableau 12 : Substances pharmacologiques utilisées pour caractériser le profil purinergique P2X des cellules microgliales BV-2.*

Substance	Référence	Solvant	Concentration solution Stock
NPS-R-568	Sigma SML2160	Éthanol / DMSO	100 µM / 5mM
NPS2143	Sigma SML0362	Éthanol / DMSO	100 µM / 5mM
Gadolinium	Sigma 439770	eau	50 mM
Spermine	Sigma S3256	eau	100 mM
Néomycine (G418)	Sigma A1720	eau	50 mg/ml
Chébérythrine	Sigma C2932	DMSO	10 mM
Résatorvide	MedChemExpress (Clinisciences) HY-1109	eau	5 µM
SB203580	Ascent Scientific Asc-162	DMSO	5 mM
Pertussis toxin (PTX)	Sigma P2980		
PD98059	Tocris 1213	DMSO	2 mM
YM254890	Tocris 7352	DMSO	1 mM
DL-Sulforaphane	Sigma S4447	eau	200 µM
LPS	Sigma L8274	eau	10 µg/ml
IL-4	BioLegend 574304	eau	0,2 mg/ml

**Tableau 13 :** Substances pharmacologiques utilisées pour la caractérisation du CaSR microglial dans la lignée BV-2

## V.2 Culture des cellules BV-2

Les cellules BV2 sont une lignée microgliale murine immortalisée par rétrovirus *v-raf/v-myc* par Blasi et al., en 1990 (Blasi et al., 1990). Ces cellules adoptent différentes formes et sont naïves au LPS. De plus, lors d'une stimulation au LPS, ces cellules montrent une surexpression de 22 gènes, dont vingt sont en commun avec ceux surexprimés par la microglie primaire murine (118 gènes) (Figure 30) (Henn et al., 2009).

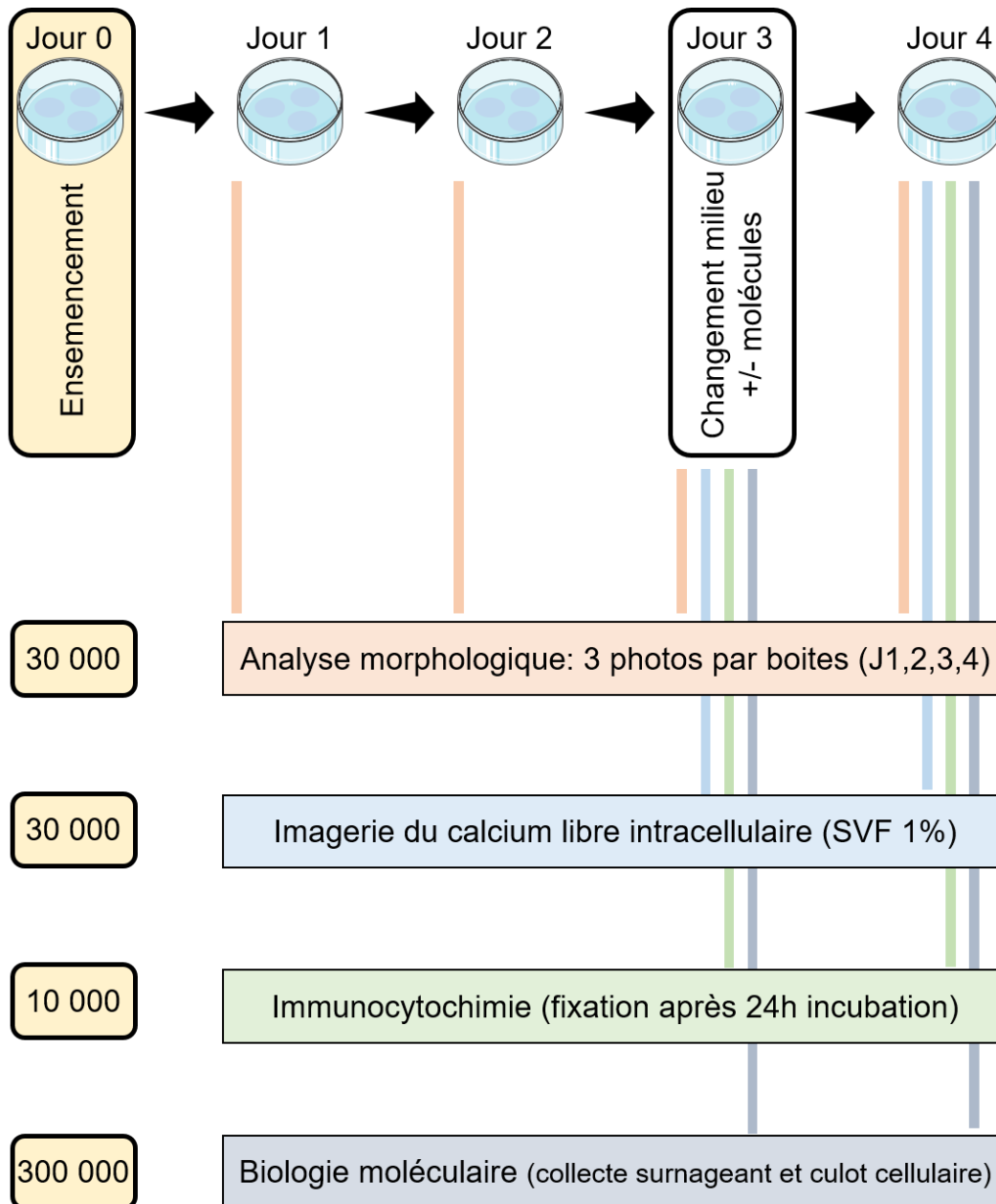


**Figure 30 :** Nombre de gènes surexprimés par les cellules BV-2 et par la microglie primaire murine, après stimulation au LPS (50 µg/ml). Adapté de Henn et al., 2009.

Les cellules BV-2 sont ensemencées dans des boîtes de culture stériles en plastique 10 cm de diamètre (Thermo Scientific Nuncon™ Delta Surface) dans un milieu de culture composé de Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) (Gibco) supplémenté avec du sérum de veau foetal

(SVF) (10% volume/volume, Gibco) et de la pénicilline-streptomycine (P/S) (50UI/ml chacun, Gibco).

Le milieu est préparé dans des tubes Falcon (GeinerBio-one, Cell Star 227270) de 50 ml stériles, puis filtré (filtre 0,2 µM). Le milieu est utilisé le jour même ou dans les 48h suivantes. Il est gardé à 4°C, et est réchauffé à 37°C avant utilisation.



*Figure 31 : Schéma général de l'organisation des expériences. Les expériences se font toujours au bout de 96h de culture et avec un changement de milieu à 72h (avec ou sans ajout de molécules).*

Les cellules sont gardées dans un incubateur à 37°C dans une atmosphère enrichie en CO<sub>2</sub> (5%) et saturée en vapeur d'eau. A environ 90% de confluence, les cellules sont détachées mécaniquement à l'aide d'une spatule stérile (FisherBrand 08-100-241), mises en suspension dans 5 ml de milieu frais (DMEM, 10% SVF, 1% P/S) en utilisant une pipette plastique stérile, puis transférées dans un tube Falcon stérile de 15 ml (GeinerBio-oneCell Star 188 261). La solution est centrifugée à 1 000 RPM pendant 3 minutes, puis le culot de cellules est remis en suspension dans du milieu frais (DMEM, 10% SVF, 1% P/S). Les cellules sont ensuiteensemencées dans les boîtes destinées aux différentes expériences (Figure 31) :

- Analyse morphologique : 30 000 cellules BV-2 sontensemencées sur des lamelles en verre stériles de 12 mm préalablement placées dans une boîte de pétri stérile de 35mm (Falcon 35 3001), le volume est ajusté à 2 ml avec du milieu frais (DMEM, 10% SVF, 1% P/S). Trois photos de champs choisis au hasard sont prises toutes les 24h (J1, 2, 3 et 4). A 72h le milieu est changé par du milieu frais, contenant ou non des substances pharmacologiques.
- Imagerie du calcium libre intracellulaire : 30 000 cellules BV-2 sontensemencées dans des boîtes d'imagerie du calcium (boite de pétri 35mm avec un fond en verre) ([Eersapah, Hugel et Schlichter, 2019](#)). Les cultures sont maintenues à 37°C dans l'incubateur. A 72h le milieu est remplacé par du milieu contenant 1% de SVF (DMEM, 1% SVF, 1% P/S). Les boîtes sont utilisées 24h après le changement de milieu.
- Biologie moléculaire : 300 000 cellules BV-2 sontensemencées dans une boite de pétri 10 cm de diamètre, le volume est ajusté à 10 ml avec du milieu frais (DMEM, 10% SVF, 1% P/S). A 72h, le milieu est remplacé par du milieu frais contenant ou non des substances. 24h après, le surnageant est récupéré.
- Immunocytologie : 10 000 cellules BV-2 sontensemencées sur des lamelles en verre de 12 mm préalablement placées dans une plaque 24 puits (GeinerBio-one 662160). Le volume est ajusté à 1 ml avec du milieu frais (DMEM, 10% SVF, 1% P/S). l'ajout des substances se fait de la même manière que pour l'analyse morphologique. Les cultures sont fixées 24h après le changement de milieu.

### V.3 Imagerie du calcium libre intracellulaire

#### V.3.1 Chargement des cellules BV-2 avec la sonde ratiométrique Fura-2

Les cultures BV-2 sont rincées plusieurs fois avec du milieu extracellulaire HEPES dont la composition est la suivante(en mM) : NaCl 125, KCl 5, CaCl<sub>2</sub> 1, MgCl<sub>2</sub> 1, Glucose 10 et HEPES 5 (Tableau 14). Le pH est ajusté entre 7,35 et 7,4. Pour certaines expériences, de l'hexokinase (2U par ml) (Sigma H-5000) a été rajoutée à la solution extracellulaire HEPES afin de diminuer la concentration ambiante d'ATP au voisinage des cellules.

Substance	Référence	Concentration [mM]
CaCl <sub>2</sub>	Sigma C3881	1 mM
NaCl	Fisher Chemical S/3160/60	125 mM
KCl	Sigma P9541	5 mM
MgCl <sub>2</sub> -6H <sub>2</sub> O	Sigma M2670	1 mM
Glucose	Sigma G8270	10 mM
HEPES	Sigma H3375	5 mM

*Tableau 14 : Concentrations et produits pour le milieu extracellulaire HEPES*

Le chargement des cellules s'effectue pendant une heure à température ambiante (22-25°C) et à l'obscurité dans du milieu extracellulaire HEPES qui contient 4µM de Fura-2-acétoxyméthylester (Fura-2-AM) (Molecular probes, USA) et 0.001% (v/v) d'acide pluronique (Molecular probes, USA). L'acide pluronique facilite le chargement des cellules en Fura-2-AM. Le fura-2-AM passe la membrane plasmique, puis le groupement acétoxyméthyle (AM) est clivé par des estérases intracellulaires, piégeant ainsi le Fura-2 dans la cellule (Oakes et al., 1988).

Après le chargement, les cultures sont rincées avec du milieu extracellulaire HEPES pour enlever le Fura-2-AM et l'acide pluronique, puis elles sont utilisées pour les expériences d'imagerie du calcium libre intracellulaire.

#### V.3.2 Mesures des variation du calcium libre intracellulaire ( $[Ca^{2+}]_i$ )

Pour suivre les changements de  $[Ca^{2+}]_i$ , les boîtes, contenant les cellules préalablement chargées avec du Fura-2, sont placées sur la platine porte objet d'un microscope inversé à fluorescence (Axiovert 35, Zeiss, Gottingen, Allemagne). La visualisation des cellules se fait grâce à un objectif



à immersion à huile, avec un grossissement de X40 (Fluor 40 ; NA, 1,30, Nikon, Tokyo, Japon). Les cellules sont exposées à un flux constant de milieu extracellulaire HEPES, maintenu à 34°C. Toutes les expériences ont été réalisées à une température de 34°C.

Les signaux sont acquis en temps réel, avec un système composé d'une caméra CCD refroidie (CoolSNAP HQ, Roper Scientific, Tucson, USA) et d'un logiciel d'analyse d'image (Imaging workbench 4.0, Axon Instruments, Molecular Devices).

Lors de l'acquisition, les cellules sont excitées alternativement à 350 nm et 380 nm grâce à des filtres placés dans une roue porte filtre (lambda-10 filterwheel, Sutter instruments, USA). La lumière émise est collectée au-dessus de 520 nm grâce à un miroir dichroïque.

Des paires d'images sont prises toutes les 1,1 secondes. Le niveau et les variations du  $[Ca^{2+}]_i$  sont exprimées en faisant le rapport (ratio) des signaux collectés à 520 nm (ratio  $F_{350}/F_{380}$ ). Le ratio est calculé après soustraction du bruit de fond.

### V.3.3 Analyse des changements de $[Ca^{2+}]_i$

Pour l'analyse, les régions d'intérêt (ROIs) sont sélectionnées manuellement grâce au logiciel Imaging workbench 4.0 (Axon Instruments, Molecular Devices) et chaque ROI correspond à une cellule. Seules les cellules ayant répondu à une substance de référence (ATP ou UTP à 20 $\mu$ M, appliquée en fin d'enregistrement) ont été retenues pour l'analyse. Les signaux acquis sont analysés avec le logiciel Clampfit 10.7.0 (Molecular Devices) qui permet de quantifier le niveau de  $[Ca^{2+}]_i$  basal ainsi que ses variations durant l'application de substances.

### V.3.4 Application des substances

Durant toutes nos expériences, les cellules sont soumises à un flux constant de milieu extracellulaire HEPES, préchauffé à 34°C. Le volume de la chambre est de 2 ml et la vitesse de perfusion de 2 à 3 ml par minute.

Les molécules d'intérêt (Tableau 12 et 13) sont appliquées localement, grâce à une perfusion par gravité permettant d'appliquer jusqu'à 12 substances différentes. Chaque substance est mise dans une seringue 5 ml, connectée par des tubes en polyéthylène à une aiguille de 0,9 mm qui se

trouve au bout du système d'application et qui est placée au bord du champ des cellules enregistrées (bord du champ microscopique).

L'application des substances se fait en ouvrant un robinet situé entre la seringue contenant la substance et le tube en polyéthylène. Lorsqu'il n'y a pas d'application de substance, une perfusion continue de milieu extracellulaire HEPES est délivrée par le système d'application. Au moment d'appliquer une substance, la perfusion du milieu extracellulaire HEPES est arrêtée et remplacé par le milieu contenant la substance à appliquer. A l'arrêt de l'application de substance la perfusion du milieu extracellulaire HEPES est reprise. Durant chaque expérience, l'absence d'artéfacts mécaniques liés par l'ouverture et/ou à la fermeture d'une seringue est vérifiée. Lors des expériences sur la lignée microgliale BV-2 aucune variation de  $[Ca^{2+}]_i$  n'a été observée suite à l'ouverture d'une seringue contenant du milieu extracellulaire HEPES. De même, l'application des solvants (DMSO, Ethanol, eau) utilisés pour la préparation des solutions stocks de substances pharmacologiques, n'a jamais produit de variations de la  $[Ca^{2+}]_i$ .

#### V.3.5 Incubation des cellules avec des substances

Pour certaines expériences, les cellules BV-2 ont été exposées à des substances.

Pour activer les cellules microgliales BV-2, du LPS (25ng/ml) est rajouté dans le milieu de culture lors du changement de milieu, 24h avant l'expérience (DMEM, 10% SVF, 1% P/S par DMEM, 1% SVF, 1% P/S). Pour induire un phénotype anti-inflammatoire, les cellules BV-2 sont incubées avec de l'IL-4 (20ng/ml) lors du changement de milieu 24h avant l'expérience (DMEM, SVF 1%, P/S 1%).

Lorsque les cellules sont pré-incubées avec de l'hexokinase (2U/ml) (Sigma H-5000), l'incubation se fait en même temps que le chargement des cellules avec le fura-2-AM, pendant une heure, à température ambiante et à l'obscurité.

#### V.3.6 Courbes doses réponses

Pour l' $\alpha\beta$ meATP, la relation concentration-réponse a été ajustée par une fonction polynomiale :  $f(x) = A1 + A2^x + A3^{x^2}$

Pour l'ATP et le BzATP, la relation concentration-réponse a été ajustée par une fonction de Hill :

$$f(x) = \frac{A1}{\left(1 + \left(\frac{A2}{x}\right)^{A3}\right)}$$

### V.3.7 Analyses statistiques

Pour effectuer les comparaisons des proportions, on utilise le test du  $X^2$  (BiostaTGV INSERM ; <https://biostatgv.sentiweb.fr/?module=tests/chideux>).

Lorsque nous comparons des amplitudes de réponse on utilise le test de student, apparié ou non. Le test statistique exact utilisé est précisé dans le texte.

Les résultats sont exprimés sous forme de Moyenne  $\pm$  s.e.m.

### V.4 Changements morphologiques

Pour évaluer les changements morphologiques induits par l'application de substances pharmacologiques (Tableau 13), 30 000 cellules BV-2 sontensemencées sur des lamelles en verre stériles de 12 mm de diamètre (trois par boîte de pétri 35 mm). Trois photos, de champs choisis au hasard, sont prises par conditions toutes les 24h (J1, 2, 3, et 4) en fond clair, à l'aide d'un microscope inversé (AXIOvert 135 TV) équipé d'une caméra (Nikon COOLPIX).

#### V.4.1 Ajout des substances

A 72h (J3), après avoir pris trois photos par condition, le milieu est remplacé par 2 ml de milieu frais contenant la/les substance(s) pharmacologique(s) d'intérêt (voir partie Matériels et Méthodes – substances pharmacologiques, Tableau 13).

Les solvants (DMSO, éthanol et eau) utilisés pour préparer les solutions stocks ont été testés individuellement et ne produisent pas de changement morphologique au bout de 24h de traitement. De même, un simple changement de milieu à 72h avec du milieu ne contenant pas de substance pharmacologique ne produit pas de changement morphologique (stress mécanique). Ce point a été vérifié dans chaque série d'expérience grâce à des boîtes «contrôles» (changement de milieu simple) qui ont été manipulées en parallèle avec les boîtes subissant un traitement.

#### V.4.2 Evaluation des changements morphologiques

Pour évaluer les changements morphologiques, les cellules ont été comptées sur chaque photo prise toutes les 24h, et classées en fonction de leur morphologie :

- Cellules allongées : lorsque le ou les prolongements ont une longueur d'au moins deux fois le diamètre du corps cellulaire (cellule verte, Figure 32).
- Cellules intermédiaires : lorsque le corps cellulaire est rond mais que des prolongements persistent et font moins de deux fois le diamètre du corps cellulaire (cellule bleue, Figure 32).
- Cellules rondes : lorsque le corps cellulaire est rond et qu'il n'y a pas de prolongement apparents (cellule rouge, Figure 32)



*Figure 32 : Exemple de cellules BV-2 en culture (48h, DMEM, 10% SVF, 1% P/S). Les cellules sont classées en fonction de leur morphologie. La cellule rouge est un exemple de cellule ronde, celle en bleu est un exemple de cellule intermédiaire et celle en vert est un exemple de cellule allongée.*

Dans le cadre de nos analyses, les cellules rondes et intermédiaires ont été regroupées, et le paramètre mesuré était le ratio entre les cellules allongées et le nombre total de cellules présentes. La comparaison de ce ratio entre les différentes conditions expérimentales permet de quantifier les changements morphologiques induits par les traitements pharmacologiques appliqués.

### V.4.3 Analyses statistiques

Pour chaque jour de culture (J1 à J4) on compte le nombre total de cellules ainsi que le nombre de cellules allongées, rondes et intermédiaires présentes dans les trois champs microscopiques sélectionnés au hasard. On compare ensuite les proportions de cellules allongées par rapport aux cellules totales comptées à chaque jour de culture (J1-J4). Le traitement pharmacologique ou le simple changement de milieu s'effectue à J3 et le résultat du traitement (absence de traitement) est évalué à J4.

Pour effectuer les comparaisons des proportions, on utilise le test du  $X^2$  (BiostaTGV INSERM ; <https://biostatgv.sentiweb.fr/?module=tests/chideux>). Dans un premier temps on compare J1, J2, J3 et J4. En cas d'absence de traitement (ou d'absence d'effet de la substance) on s'attend à ne pas avoir de différence significative ( $p > 0,05$ ) au sein de la série. L'absence d'effet significatif dans le cas des traitements «contrôle» (simple changement de milieu) est impérative. Si une différence significative est observée dans les conditions «contrôle», l'ensemble de la série expérimentale (avec traitement pharmacologique) est éliminée. S'il n'y a pas de différence significative on passe à l'analyse des traitements pharmacologiques.

Si une substance pharmacologique a un effet (positif ou négatif) on s'attend à avoir une différence dans le test du  $X^2$  effectué sur la série J1-J4. Cependant pour valider cet effet nous procédons dans un deuxième temps à un test du  $X^2$  sur la période J1-J3 (en excluant le point J4 qui devrait être à l'origine de la différence sur la série complète). Si le test sur J1-J3 ne montre pas de différence significative, cela signifie que durant cette période J1-J3 (équivalente à une période contrôle, c'est-à-dire sans traitement), il n'y a pas eu de variabilité dans la proportion de cellules allongées. Dans ce cas l'effet significatif observé dans la série J1-J4 est validé comme un effet significatif de la substance pharmacologique ajoutée à J3.

Si le test sur la période J1-J3 montre une différence significative, la boîte est exclue.

En résumé, pour valider l'effet d'une substance pharmacologique sur la morphologie des cellules BV-2, nous avons utilisé des conditions très stringentes afin d'éliminer autant que possible des

variations «spontanées» de morphologie cellulaire. Pour valider un effet d'une substance il faut satisfaire simultanément aux trois critères suivants :

1) Absence d'effet significatif dans les boîtes non traitées (contrôle avec changement de milieu à J3).

2) Effet statistiquement significatif sur la série J1-J4 en présence du traitement.

3) Absence d'effet significatif sur la série J1-J3.

Pour les représentations graphiques sous forme d'histogrammes, nous calculons le rapport du nombre de cellules allongées présentes à J4 sur le nombre total de cellules comptées à J4. Ces rapports sont ensuite moyennés entre différentes séries expérimentales pour chaque condition.

Les résultats sont exprimés sous forme de Moyenne  $\pm$  erreur à la moyenne (s.e.m.).

#### V.5 Immunocytochimie

Après avoir changé le milieu à 72h de culture et ajouté les substances pharmacologiques (voir partie Matériels et Méthodes – substances pharmacologiques, Tableau 13), les cellules sont replacées dans l'incubateur (37°C, atmosphère saturée en eau, 5% CO<sub>2</sub>) pendant 24h. Ensuite, les cellules sont lavées trois fois avec du milieu extracellulaire HEPES (en mM) : NaCl 125, KCl 5, CaCl<sub>2</sub> 1, MgCl<sub>2</sub> 1, Glucose 10 et HEPES 5 (Tableau 14). Le pH est ajusté entre 7,35 et 7,4 et le milieu est chauffé à 37°C avant les lavages.

Les cellules BV-2 adhérentes sur les lamelles en verre de 12 mm de diamètre, sont fixées avec du paraformaldéhyde (PFA) (EMS 15715-5) à 4% dilué dans du tampon phosphate (*Phosphate Buffer Saline*, PBS) 1X (Euromedex ET330-A) pendant dix minutes, à température ambiante. Les cellules fixées sont rincées trois fois avec du PBS 1x à température ambiante.

Les membranes de cellules sont ensuite perméabilisées pendant 10 minutes avec du PBS 1x contenant du Triton X-100 0,1% (Sigma R22-41 S26-36-23), puis lavées trois fois avec du PBS 1x. Les sites de liaison aspécifiques des anticorps secondaires sont saturés pendant une heure, à 37°C avec une solution PBS 1x contenant de l'albumine de sérum bovin(BSA) 3% (Sigma A7030) et 10%

de sérum de chèvre (D. Dutscher S2000-100). Cette étape est suivie de trois lavages avec du PBS 1x, BSA 3%, à température ambiante.

Les anticorps primaires sont utilisés aux dilutions suivantes dans du PBS 1x, BSA 3% :

- Anti CaSR, dilution finale 1/1000 (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific MA1-934).
- Anti CD68, dilution finale 1/1000 (Abcam 125212).
- Anti CD206, dilution finale 1/1000 (Abcam 64693).

Les incubations avec les anticorps primaires se font pendant une nuit à 4°C, et les cellules sont ensuite rincées trois fois avec du PBS 1x, BSA 3%, à température ambiante.

Les anticorps secondaires, sont dilués dans du PBS 1x, BSA 3% :

- Anticorps de chèvre anti lapin couplé au fluorochrome Alexa 594, dilution finale 1/1000 (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific A32740).
- Anticorps de chèvre anti souris couplé au fluorochrome Alexa 488, dilution finale 1/1000 (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific A32723).

Les cellules sont incubées avec les anticorps secondaires pendant une heure à température ambiante et à l'obscurité. Elles sont ensuite lavées trois fois avec du PBS 1x à température ambiante.

Les noyaux cellulaires sont marqués avec la sonde Hoechst (ThermoFisher 62249) et l'actine est marquée avec la phalloïdine Atto 647N (Bio Reagent 65906). Les deux marqueurs sont dilués au 1/1000ème dans du PBS 1x et l'incubation se fait durant dix minutes à l'obscurité et à température ambiante. Les cellules sont rincées trois fois avec du PBS 1x, puis montées en sandwich sur des lames préalablement nettoyées avec de l'éthanol absolu.

Les lames sont mises à 4°C dans un endroit sec pour permettre au milieu de montage (DAKO Fluorescence Mounting médium S3023) de polymériser (24h), jusqu'à l'observation des échantillons, qui se fait généralement dans les 48h suivant le montage des lamelles sur lames. Les lames sont mises à température ambiante deux heures avant observation au microscope confocal (Leica SP5 II).

### V.5.1 Acquisition - microscopie confocale

L'acquisition est faite avec un microscope confocal (Leica SP5 II) équipé d'un objectif à immersion à huile, grossissement x63 (Plan Achromat, n.a. = 1.4).

Par lamelle, trois champs larges (x63) sont étudiés. Chaque champ comprend entre 10 et 20 cellules individuelles (x63 avec un facteur zoom x6). Ces cellules sont utilisées pour l'analyse.

### V.5.2 Réglages utilisés pour l'acquisition d'images

	<b>PMT1 (600V)</b>	<b>PMT2 (700V)</b>	<b>PMT3 (800V)</b>
<b>CaSR</b>	Hoechst Laser 405	Alexa 488 Laser 488	Phalloïdine-atto-647N Laser 633
<b>CD206</b>		Alexa 594 Laser 561	
<b>CD68</b>		Alexa 594 Laser 561	

Tous les lasers sont réglés à 20% de leur puissance maximale et le smart offset est fixé à -0,5%.

### V.5.3 Analyse des intensités de fluorescence

Les images sont converties au format .tif puis l'analyse est effectuée grâce au logiciel **Icy** (version 2.4.0.0). Pour l'analyse, les ROIs sont sélectionnées manuellement (une cellule équivaut à une ROI), grâce au logiciel Icy, puis affiné en utilisant l'intensité de fluorescence de la phalloïdine Atto 647-N (marquage de l'actine et donc du contour de la cellule). Les signaux acquis sont exportés puis analysés avec la suite Microsoft Office (Excel) permettant de quantifier l'intensité totale de la ROI, ainsi que l'expression dans la région subplasmalemmale (région membranaire et sous membranaire).

### V.5.4 Analyse statistique

L'analyse statistique a été faite avec le logiciel GraphPad Prism et pour les représentations graphiques sous forme d'histogrammes, nous prenons la valeur moyenne de l'intensité des pixels de chaque ROI qui est moyennée entre les différentes expériences pour chaque condition.



Nous avons utilisé le test de Kruskal Wallis (ANOVA non paramétrique) suivi du test post hoc de Dunn (*Dunn's post hoc*) pour évaluer les différences entre nos différentes conditions.

Les résultats sont exprimés sous forme de Moyenne  $\pm$  s.e.m.

#### V.6 Biologie moléculaire

300 000 cellules sontensemencées dans une boîte de pétri 10 cm de diamètre. 72h après le milieu extracellulaire est remplacé par du milieu frais avec ou sans ajout de molécules (voir partie Matériels et Méthodes – substances pharmacologiques, Tableau 13). Après 24h de traitement, le surnageant et les cellules sont récoltés de manière séparée. Les cellules sont stockées à -20°C pour une utilisation future (extraction d'ARN messagers). Le surnageant est utilisé pour quantifier les molécules pro ou anti-inflammatoire sécrétées en fonction des différentes conditions grâce à un kit : *Proteome Profiler AntibodyArray– Mouse Cytokine Array Panel A* (RnDsystems, ARY006).

Cette cytokine array comprend quatre membranes, tous les produits nécessaires à son utilisation, ainsi qu'un protocole permettant une utilisation optimale.

La détection des cytokines est faite selon le protocole indiqué par le fabricant. Les membranes sont révélées par chemiluminescence (ChemidocTouch) en les exposant pendant dix minutes et en prenant une image toutes les trente secondes (vingt images au total). Les images sont exportées au format .tif.

L'analyse faite jusqu'à maintenant est non quantitative : augmentation, diminution ou pas de changement entre les différentes conditions.

# VI. Résultat

## VI.1 Caractérisation de récepteurs-canaux P2X de l'ATP exprimés par les cellules BV-2

### VI.1.1 Contexte : ATP et cellules microgliales

Les cellules microgliales explorent en permanence leur environnement afin de détecter des changements dans la composition du milieu extracellulaire. Ainsi elles détectent l'invasion de pathogènes grâce à la présence de récepteurs pour les PAMPs (Pathogen-Associated Molecular Patterns) et les dommages cellulaires grâce à la présence de récepteurs pour les DAMPs (Damage-Associated Molecular Patterns). L'adénosine triphosphate (ATP) est une molécule de signalisation extracellulaire très répandue dans et en dehors du système nerveux. C'est un messager extracellulaire impliqué dans la communication entre cellules gliales ainsi qu'entre neurones et cellules gliales (Inoue, Kiozumi et Tsuda, 2007). Il est maintenant clairement établi que l'ATP est un gliotransmetteur (Inoue, Kiozumi et Tsuda, 2007) et qu'il peut être colibéré synaptiquement avec des neurotransmetteurs classiques, excitateurs ou inhibiteurs, par les neurones (Edwards, Gibb et Colquhoun, 1992) (Mori et al., 2001) (Jo et Schlichter, 1999). Ainsi, il semble que l'ATP puisse servir à la fois de neurotransmetteur et de messager agissant sur les cellules gliales environnantes pour les informer de l'intensité de l'activité synaptique. L'ATP est également libérée dans un contexte pathologique, par exemple lors de lésions tissulaires ou dans des situations inflammatoires (Di Virgilio, 2023). Par conséquent la détection des niveaux d'ATP extracellulaire est cruciale pour connaître l'état homéostatique des tissus et notamment du parenchyme cérébral.

L'ATP extracellulaire peut se lier à deux familles de récepteurs : des récepteurs-canaux cationiques avec une forte perméabilité aux ions  $\text{Ca}^{2+}$  (récepteurs P2X) et des récepteurs métabotropes qui par l'intermédiaire de protéines G hétérotrimériques modulent les concentrations intracellulaires de seconds messagers ( $\text{IP}_3/\text{Ca}^{2+}$ , AMPc) (Fields et Burnstock, 2006). Les données de la littérature suggèrent la présence fonctionnelle de récepteurs P2X4 et P2X7 ainsi

que de récepteurs P2Y2, P2Y12 et P2Y13 à la membrane des cellules microgliales (Fields et Burnstock, 2006). Il est classiquement admis que les faibles concentrations d'ATP sont détectées par des récepteurs P2Y (P2Y12 et/ou P2Y13) et que les fortes concentrations activent des récepteurs P2X4 et P2X7 (Calovi, Mut-Arbona et Sperlágh, 2019). Dans les cellules microgliales primaires ainsi que dans les cellules BV-2 seuls les récepteurs P2X4 et P2X7 ont été mis en évidence au plan fonctionnel. Malgré la présence d'ARNm, des récepteurs P2X1, P2X3 et P2X5 n'ont pas été détectés (Calovi, Mut-Arbona et Sperlágh, 2019).

Dans ce contexte, nous avons décidé de réexaminer cette question en utilisant notre modèle de culture standardisé et reproductible de cellules microgliales BV-2. Nous avons testé l'effet de différents agonistes et antagonistes des récepteurs P2X sur la  $[Ca^{2+}]_i$  dans les mêmes conditions expérimentales que celles utilisées pour les études morphologiques (voir section *Matériels et Méthodes*). Les enregistrements ont été effectués au 4ème jour de culture. Certaines des cultures ont été prétraitées au Jour 3 par des substances pharmacologiques (LPS 25 ng/mL ou IL-4 20 ng/ml) et les résultats comparés à ceux obtenus sur des cultures «contrôles» (non traitées). Dans nos expériences nous avons utilisé des agonistes ( $\alpha\beta$ metATP, GTP) ou des antagonistes (Brillant blue G (BBG), TNP-ATP, Suramine (SUR), 5-BDBD, A740003, AZ10606120) qui discriminent entre certains récepteurs P2X ainsi que des agonistes activant l'ensemble des récepteurs (ATP, ADP (agonistes endogènes) et BzATP).

### VI.1.2 Stratégie expérimentale

Le problème majeur auquel nous étions confrontés au début de notre étude était de connaître spécifiquement les caractéristiques pharmacologiques des récepteurs P2X de souris. En effet, la plupart de données disponibles dans la littérature concernent les récepteurs de rat et les récepteurs humains (Illes et al., 2021). Néanmoins, une recherche approfondie dans la littérature nous a permis de trouver et de regrouper des indications sur l'affinité de certains agonistes et antagonistes pour les récepteurs P2Xs de souris. Ces données sont consignées dans le tableau 15. A noter que pour les cas où les données pour la souris n'étaient pas disponibles, nous avons reporté dans le tableau les valeurs pour les récepteurs humains qui sont d'une manière générale

assez proches de celles de la souris, alors que celles pour les récepteurs de rat sont très différentes (à la fois qualitativement et quantitativement). Le cas échéant, les valeurs pour les récepteurs humains sont surlignées en bleu dans le tableau et ceux du rat en gris.

#### AGONISTES

	P2X1	P2X3	P2X4	P2X5	P2X7	P2X1/5
ATP	0,3	12	5,3	4	200	0,4
abmeATP	4	5,6	7	12		0,46
BzATP	7,7	7,1	5,5 (65%)	6	100	
ADP	10	100	28	18		13

#### ANTAGONISTES

SUR	>10	10	100	4	20	
TNP-ATP	0,3	0,04	4	60		0,1

BBG			3	0,5	>100	
NF449	0,03					0,02
5-BDBD			2			

*Tableau 15* : Tableau résumé des  $EC_{50}$  et  $IC_{50}$  en  $\mu M$  pour les récepteurs P2Xs de souris. Lorsque les informations pour les récepteurs P2Xs de souris ne sont pas disponibles ceux des P2Xs humains (bleu) ou de rats (gris) sont reportés.

Nous avons ensuite représenté les valeurs des  $pEC_{50}$  (Figure 33) et  $pIC_{50}$  (Figure 34) pour chacun des types de récepteurs, et nous avons matérialisé sous forme de lignes horizontales sur les mêmes graphiques, les concentrations d'agoniste et d'antagonistes utilisés dans notre étude.

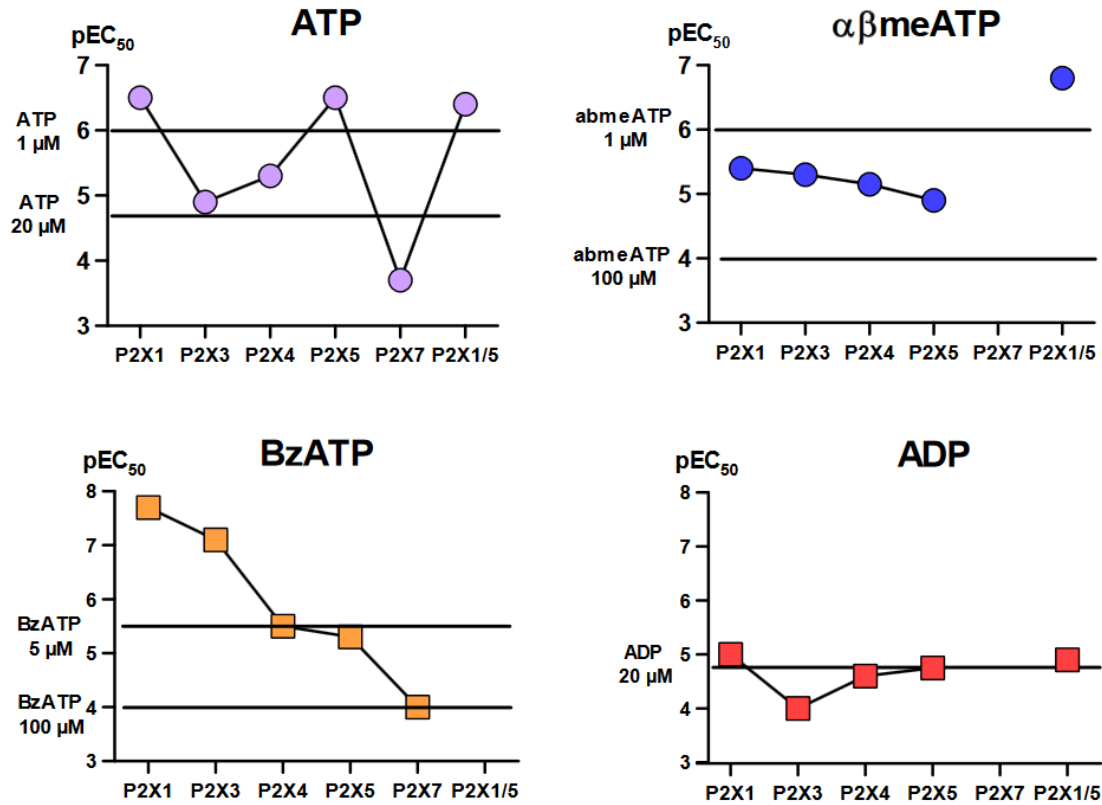


Figure 33:  $pEC_{50}$  pour chacun des types de récepteurs en fonction des différents agonistes (ATP,  $\alpha\beta$ metATP, BzATP et ADP).

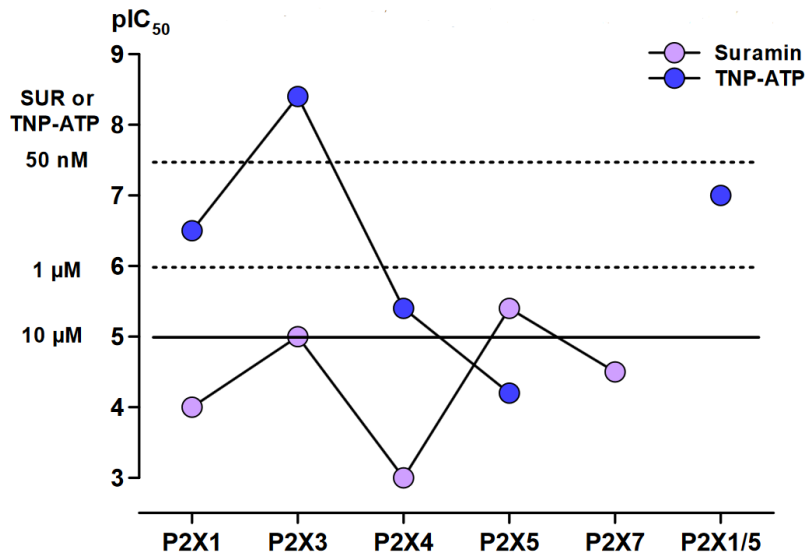


Figure 34:  $pIC_{50}$  pour chacun des types de récepteurs en fonction des différents antagonistes (Suramin et TNP-ATP).

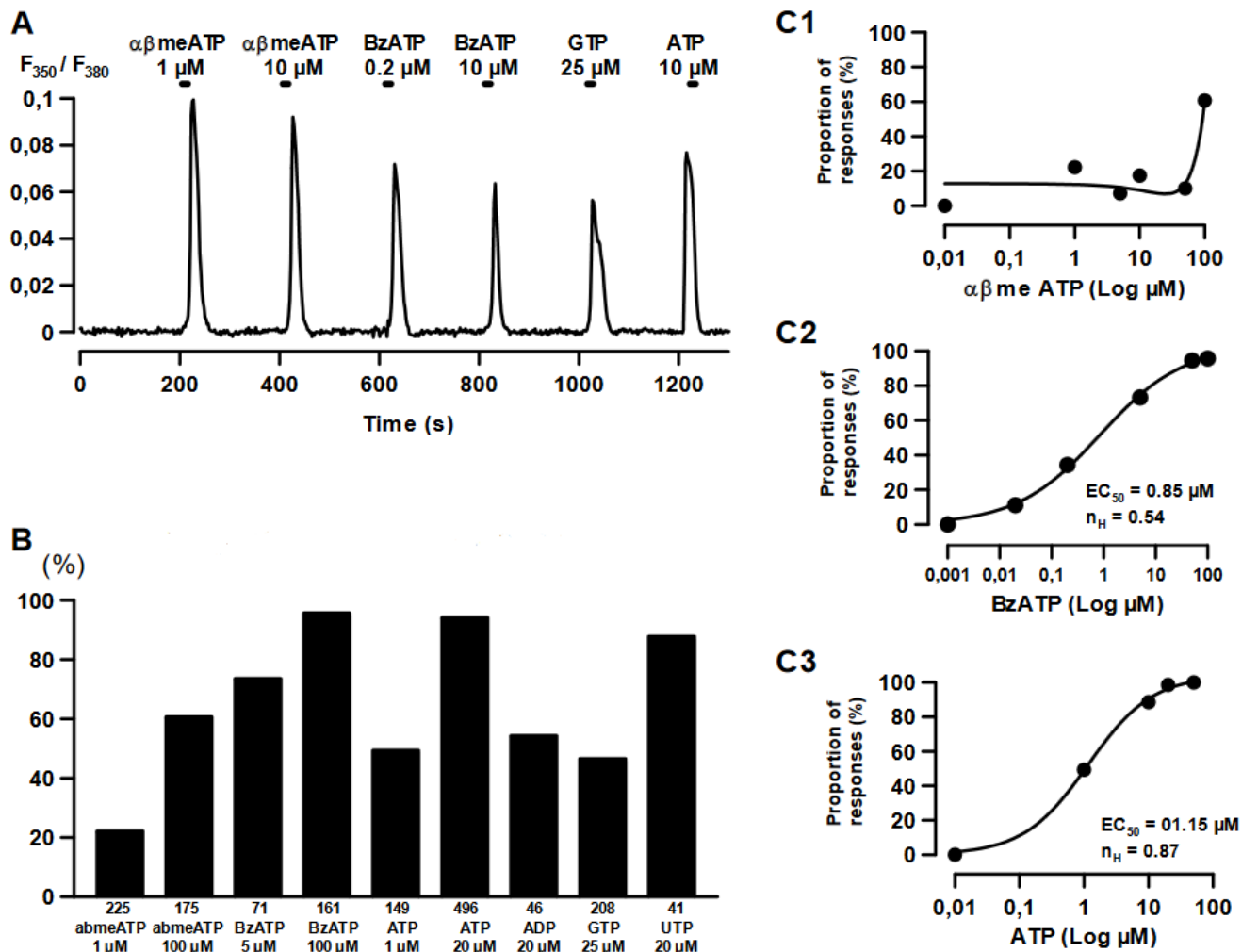
Concrètement, lorsque le point sur la figure des agonistes se trouve au-dessus de la ligne horizontale (concentration d'agonistes utilisées), cela représente une activation forte ( $>50\%$ ,  $>EC_{50}$ ) du récepteur concerné (d'autant plus forte que la distance entre la ligne et le point est grande). Par contre, lorsque le point sur le graphique se trouve en-dessous de la ligne, cela représente une activation faible ( $<50\%$ ,  $<EC_{50}$ ). Pour ce qui est des antagonistes, le raisonnement est similaire, plus le point se trouve au-dessus de la ligne horizontale, plus le degré d'inhibition du type de récepteur considéré sera grand, et plus le point se trouvera en-dessous de la ligne horizontale, plus le degré d'inhibition du type de récepteur considéré sera faible.

En pratique, ce type de représentation permet (1) de prédire l'effet éventuel qu'aura un agoniste ou un antagoniste donné dans le cas où le récepteur d'intérêt est présent et (2) de guider le choix des concentrations d'agonistes et d'antagonistes à utiliser expérimentalement.

### VI.1.3 Effet de divers agonistes sur la $[Ca^{2+}]_i$ des cellules BV-2

La Figure 35A illustre les effets de l'application d' $\alpha\beta$ meATP (1 et 10  $\mu$ M), de BzATP (0,2 et 10  $\mu$ M) de GTP (25  $\mu$ M) et d'ATP (10  $\mu$ M) sur la  $[Ca^{2+}]_i$  dans une cellule BV-2 en culture. Les durées d'application d'agoniste, dans cette figure et les suivantes, consistaient en des applications de 20s qui étaient pratiquées toutes les 180s (3 min). Les réponses aux différents agonistes consistaient toujours en des augmentations relativement rapides de la  $[Ca^{2+}]_i$  qui retournait en quelques secondes à sa valeur initiale (basale) après la fin de l'application. Toutes les cellules ne répondaient pas forcément à toutes les substances testées et la Figure 35B présente la proportion de cellules répondant à un agoniste donné pour une concentration donnée. On note que la quasi-totalité des cellules répondent à de fortes concentrations de BzATP (100  $\mu$ M) ainsi qu'à des concentrations de 20  $\mu$ M d'ATP ou d'UTP, alors que pour d'autres agonistes, même appliqués à forte concentration tels que  $\alpha\beta$ meATP (100  $\mu$ M), GTP (25  $\mu$ M) ou ADP (20  $\mu$ M), cela n'induit des réponses que dans des sous-populations de cellules.

Nous avons réalisé des relations concentration-réponse pour l' $\alpha\beta$ meATP, le BzATP et l'ATP. Les courbes obtenues sont illustrées dans la Figure 35C. Pour l' $\alpha\beta$ meATP, la relation concentration-réponse est complexe et ne pouvait pas être ajustée par une fonction de Hill mais plutôt par une fonction polynomiale (Figure 35 C1). On observe que la proportion de réponses est stable entre 1 et 50  $\mu$ M puis on note une augmentation brusque pour une concentration de 100  $\mu$ M. Ces observations suggèrent qu'il doit exister une sous-population de cellules (environ 20% des cellules) qui répond à de faibles concentrations d' $\alpha\beta$ meATP et que l'activation des récepteurs est déjà maximale à 1  $\mu$ M d' $\alpha\beta$ meATP. Une deuxième population semble se rajouter à partir d'une concentration d' $\alpha\beta$ meATP de 100  $\mu$ M (voir Figure 35B et 35C1 graphique des  $pEC_{50}$  et discussion). Les relations concentration-réponse pour le BzATP (Figure 35 C2) et pour l'ATP (Figure 35 C3) présentent des courbes classiquement attendus pour ce type de relation. L'ajustement par une fonction de Hill a permis de déterminer des concentrations efficaces ( $EC_{50}$ ) de 0.85  $\mu$ M et de 1,15  $\mu$ M pour le BzATP et l'ATP, respectivement. Les nombres de Hill ( $n_H$ ) étaient de 0.54 et 0.87 respectivement.



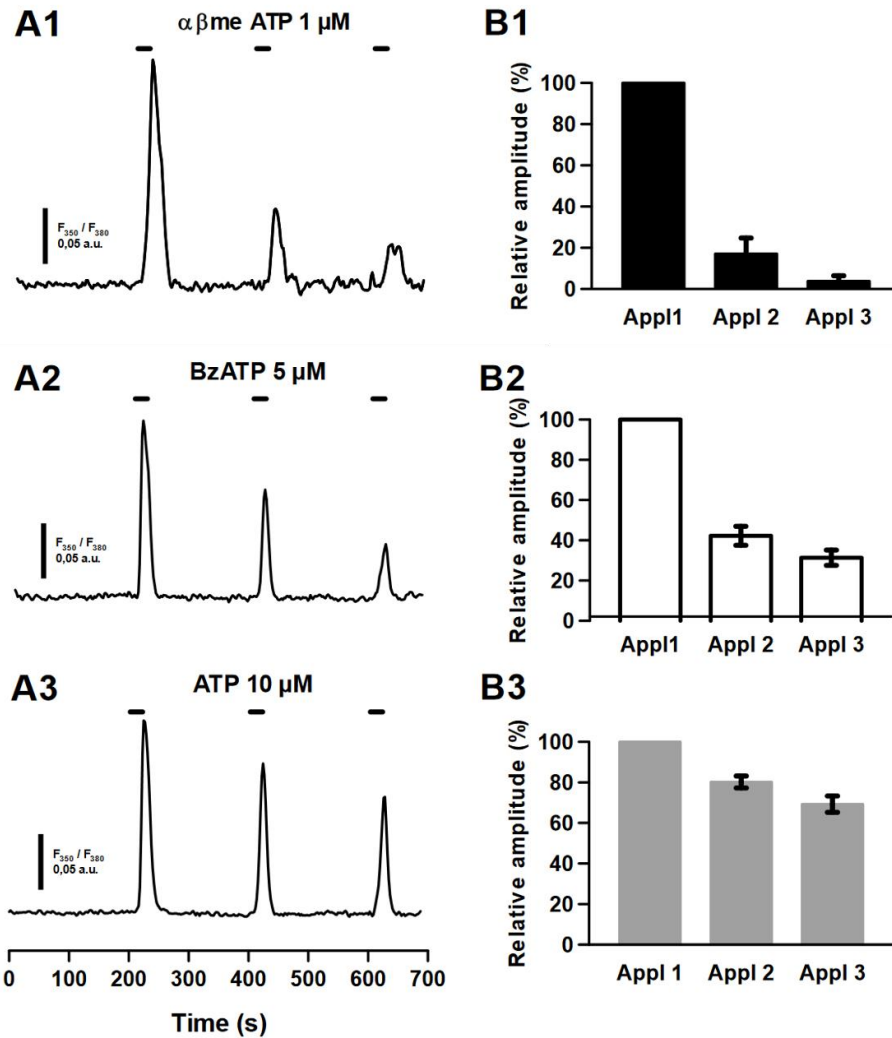
*Figure 35 : Effet de divers agonistes sur la  $[Ca^{2+}]_i$  des cellules BV-2. La figure 35A illustre les effets de l'application d' $\alpha\beta$ meATP (1 et 10  $\mu$ M), de BzATP (0,2 et 10 $\mu$ M) de GTP (25 $\mu$ M) et d'ATP (10 $\mu$ M) sur la  $[Ca^{2+}]_i$ . La figure 35B représente la proportion de cellules répondant à un agoniste. Les Figures 35C 1-3 représentent la relation doses-cellules répondant pour l' $\alpha\beta$ metATP (C1), pour le BzATP (C2) et pour l'ATP (C3).*



#### VI.1.4 Désensibilisation des réponses aux agonistes

Même lorsque les intervalles entre deux applications consécutives du même agoniste étaient de 180s, nous avons observé une désensibilisation des réponses (Figure 36 A 1-3).

Dans le cas de l' $\alpha\beta$ meATP, même utilisé à une concentration apparemment faible de 1  $\mu$ M, nous avons observé une diminution importante de la deuxième et de la troisième réponse. Ainsi, en termes d'amplitude, les deuxième et troisième réponses représentaient  $17,1 \pm 7,6 \%$  ( $n=8$ ) et  $3,8 \pm 2,6 \%$  ( $n=8$ ) de la première réponse (normalisée à 100%) (Figure 36 B1). Il faut noter que dans 4 cas sur 8, il n'y pas eu de 2ème ni de 3ème réponse suite à l'application d' $\alpha\beta$ meATP (1  $\mu$ M). Cette situation traduit l'implication potentielle de récepteurs qui présentent une forte désensibilisation, tels que P2X1 ou P2X3 (voir ci-dessous). Dans le cas du BzATP (Figure 36 B2), nous avons également observé une désensibilisation de la réponse, mais celle-ci était plus faible que celle observée avec l' $\alpha\beta$ meATP (1  $\mu$ M). Ainsi les deuxième et troisième réponses à l'application de BzATP (5  $\mu$ M) représentaient  $42,2 \pm 7,6 \%$  et  $33,3 \pm 3,8 \%$  ( $n=34$ ) de la première réponse. Les réponses à l'ATP (10  $\mu$ M) présentaient peu de désensibilisation : 2ème réponse  $80,2 \pm 2,9 \%$  et 3ème réponse  $69,3 \pm 4,0 \%$  ( $n=32$ ) (Figure 36 B3). Les amplitudes relatives des 2ème et 3ème réponses en condition «contrôle» à ces 3 agonistes ont été utilisées par la suite pour estimer les effets des antagonistes appliqués lors des 2ème et 3ème applications d'agonistes (voir ci-dessous et Figure 36 B1-3).



**Figure 36:** Désensibilisation des réponses aux agonistes. Les figures A1-3 illustrent les effets d'application répétés : (A1)  $\alpha\beta\text{meATP } 1 \mu\text{M}$  ; (A2)  $\text{BzATP } 5 \mu\text{M}$ , (A3)  $\text{ATP } 10 \mu\text{M}$ ) sur la  $[Ca^{2+}]_i$ . Les graphiques B1-3 représentent l'amplitude de la 2ème et 3ème réponse par rapport à la première réponse (100%). Moyenne  $\pm$  s.e.m.

### VI.1.5 Effets des antagonistes des récepteurs P2X1 et P2X3

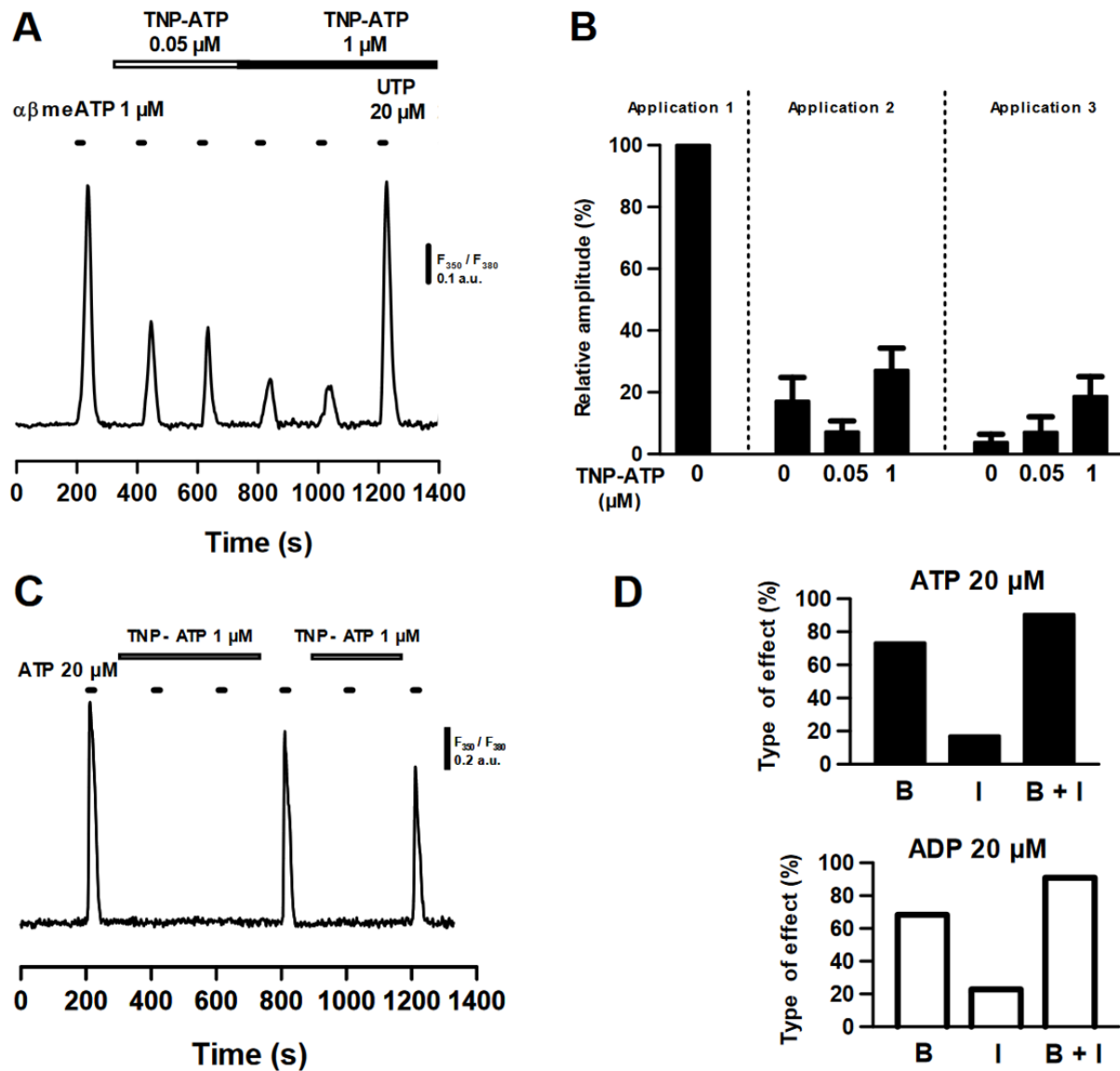
La présence de réponses à de faibles concentrations d' $\alpha\beta\text{meATP}$  indique la présence de récepteurs P2X1 et/ou P2X3. Nous avons donc testé les effets du TNP-ATP, un antagoniste qui inhibe sélectivement les récepteurs P2X3 homomériques à une concentration de 50 nM (Voir Figure 34) (Zhong, Dunn et Burnstock, 2000) et partiellement/faiblement les récepteurs P2X1 homomériques à une concentration de 1  $\mu\text{M}$  (Ikeda, 2007).

La figure 37A illustre les effets des deux concentrations de TNP-ATP (50 nM et 1  $\mu$ M) sur les réponses évoquées par l'application d' $\alpha\beta$ meATP 1 $\mu$ M. On note une diminution de l'amplitude des réponses à l' $\alpha\beta$ meATP. Cependant, comme nous l'avons vu précédemment les réponses  $\alpha\beta$ meATP (1  $\mu$ M) présentent une forte désensibilisation. Une analyse quantitative montre que le TNP-ATP n'affecte pas significativement l'amplitude de la réponse  $\alpha\beta$ meATP par rapport à la situation contrôle dans laquelle les amplitudes des 2ème et 3ème réponses à l' $\alpha\beta$ meATP baissent fortement par rapport à celle de la première. En effet, l'amplitude de réponse moyenne à l' $\alpha\beta$ meATP 1 $\mu$ M passe de  $17,1 \pm 7,6$  % (n=8) à  $7,2 \pm 3,5$  % (n=10) (p = 0.22, test de Student non apparié) en présence de TNP-ATP 50nM, et de  $19, \pm 6,0$  % (n=8) à  $27,2 \pm 7,1$  %(n=10) (p = 0.24, test de Student non apparié) en présence de TNP-ATP 1  $\mu$ M. L'ensemble des résultats est résumé sous forme d'histogramme dans la Figure 37B.

Ces résultats suggèrent que dans nos conditions les réponses à l' $\alpha\beta$ meATP ne semblent pas mettre en jeu des récepteurs P2X1 et P2X3 homomériques (voir ci-dessous).

Afin d'être sûr que les récepteurs P2X1 et P2X3 soient activés significativement, nous avons ensuite utilisé l'ATP à une concentration de 20  $\mu$ M comme agoniste afin de recruter l'ensemble des récepteurs P2X potentiellement présents (excepté P2X7). La Figure 37C, illustre une cellule dans laquelle le TNP-ATP (1  $\mu$ M) a complètement bloqué la réponse à l'ATP (20  $\mu$ M) et ceci de manière reproductible et réversible. Un blocage total de la réponse n'a pas systématiquement été observé et la Figure 37D montre le pourcentage de cellules dans lesquelles nous avons observé un blocage total (B) ou une inhibition (I) de la réponse à l'ATP (20  $\mu$ M) (panneau du haut). Nous avons également représenté la proportion correspondant à la somme de B et de I (B+I). Le même type d'histogramme a été construit pour les réponses à l'ADP (20  $\mu$ M) (panneau du bas). Pour les réponses à l'ATP nous avons observé les proportions suivantes : B=73.3%, I=17.1% et B+I=90.5% (n=105). Pour l'ADP les proportions étaient : B=68.2%, I = 22.7% et B+I=90.9% (n=22). Ces résultats montrent que les réponses à l'ATP et à l'ADP (10  $\mu$ M) sont bloquées ou inhibées par le TNP-ATP (1  $\mu$ M) dans la grande majorité des cellules (90%) et ceci dans des proportions comparables pour les 2 agonistes. En se référant à la Figure 34 ( $pIC_{50}$  des antagonistes) on voit

qu'à une concentration de 1  $\mu\text{M}$ , le TNP-ATP inhibe très fortement les récepteurs homomériques P2X1 et P2X3 ainsi que les récepteurs hétéromériques P2X1/5.

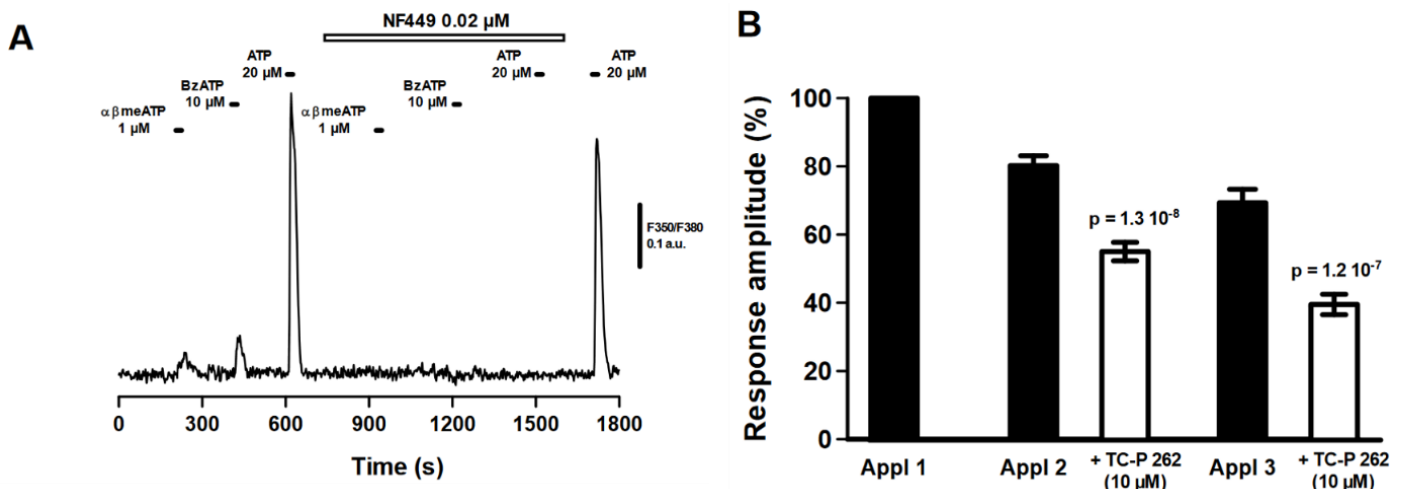


*Figure 37* : Effets du TNP-ATP sur la réponse des récepteurs P2X1 et P2X3. (A). Effets de deux concentrations de TNP-ATP (50nM et 1 $\mu\text{M}$ ) sur les réponses évoquées suite à l'application d' $\alpha,\beta\text{metATP}$ . (B) représente ces résultats sous forme d'histogramme. Moyenne  $\pm$  s.e.m. (C) Exemple d'une cellule où le TNP-ATP (1 $\mu\text{M}$ ) bloque la réponse à l'ATP (20 $\mu\text{M}$ ) de manière reproductible et réversible. (D) illustre, sous forme d'histogramme le % de cellules avec un bloque total (B) ou une inhibition (I) de la réponse à l'ATP (20 $\mu\text{M}$ ) (haut) ou à l'ADP (20 $\mu\text{M}$ ).

Nous avons ensuite testé l'effet de deux antagonistes spécifiques des récepteurs P2X1 (NF449) (Rettinger et al., 2005) et des récepteurs P2X3 (TC-P262) (Ballini et al., 2011).

Le NF449 (20 nM) a réversiblement bloqué les réponses induites par l'ATP (20  $\mu$ M) dans toutes les cellules testées (n=19) mais également les réponses induites par l' $\alpha\beta$ meATP (1  $\mu$ M) et le BzATP (10  $\mu$ M) dans les mêmes cellules (Figure 38A).

Le TC-P262 a inhibé, mais n'a jamais complètement bloqué, les réponses ATP (20  $\mu$ M) comme cela est illustré dans la Figure 38B. Pour quantifier les effets du TC-P262 (10  $\mu$ M) nous avons comparé les amplitudes moyennes des réponses à l'ATP en présence de l'antagoniste à celle des réponses de même rang obtenues lors d'application répétées d'ATP (10  $\mu$ M) dans l'étude sur les désensibilisations des réponses aux agonistes des récepteurs P2X (voir ci-dessus, paragraphe «Désensibilisation des réponses aux agonistes»). Les réponses de 2ème rang étaient de  $80,2 \pm 2,9$  % (n=32) (contrôle) et  $55,1 \pm 2,7$  % (n=80) en TC-P262 (10  $\mu$ M). Ces amplitudes de réponses étaient significativement différentes ( $p = 1,3 \cdot 10^{-8}$ , test de Student non apparié). De même pour les réponses de 3ème ordre, les amplitudes étaient de  $69,3 \pm 4,0$  % (n=32) (contrôle) et  $39,6 \pm 3,0$  % (n=80) (TC-P262 10  $\mu$ M). Ces amplitudes de réponses étaient significativement différentes ( $p = 1,2 \cdot 10^{-7}$ , test de Student non apparié).



**Figure 38:** Effets du NF449 et du TC-P 262 sur la réponse des récepteurs P2X1 et P2X3. (A) Effet du NF449 (20nM) sur les réponses  $\alpha\beta$ meATP 1 ( $\mu$ M); BzATP (10 $\mu$ M), ATP (20 $\mu$ M). (B) Effet du TC-P 262 (10 $\mu$ M) sur les réponses ATP (10 $\mu$ M). Moyenne  $\pm$  s.e.m.

L'ensemble de ces données indique la présence de récepteurs homo- ou hétéromériques contenant les sous unités P2X1 et P2X3 et qui sont activés par l'ATP (20  $\mu$ M).

#### VI.1.6 Effets des antagonistes des récepteurs P2X4 et P2X7

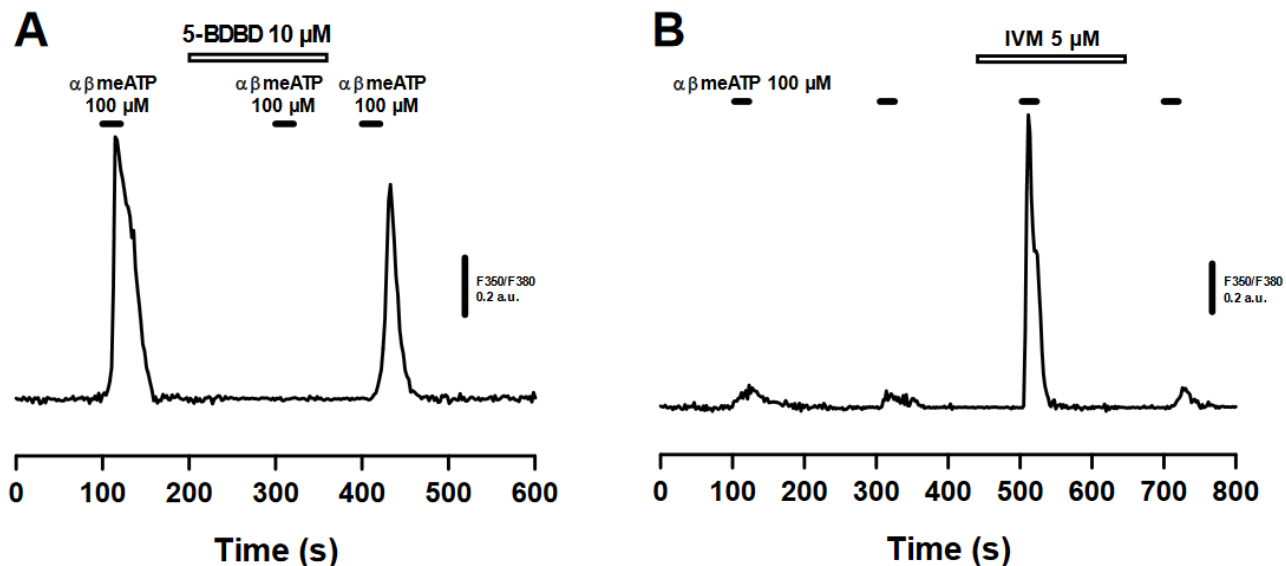
La présence de récepteurs P2X4 et P2X7 sur les cellules microgliales primaires et les cellules BV-2 est bien documentée dans la littérature (Dubyak, 2007). Nous avons voulu vérifier la présence de ces récepteurs dans nos conditions de cultures strictes et reproductibles.

**Récepteurs P2X4** : L'application d' $\alpha\beta$ meATP à forte concentration (100  $\mu$ M) active peu ou pas le récepteur P2X4 de souris. En fait, ce sujet est controversé, la littérature indiquant soit une insensibilité (Sim et al., 2007), un  $EC_{50} > 100$   $\mu$ M (et une efficacité de 38%) (Abdelrahman et al., 2017) ou un  $EC_{50}$  micromolaire (7  $\mu$ M et une efficacité de 29%) (Jones et al., 2000) pour l' $\alpha\beta$ meATP.

La Figure 39A illustre le cas d'une cellule dans laquelle nous avons observé une réponse forte à l' $\alpha\beta$ meATP (100  $\mu$ M). Cette réponse était réversiblement bloquée par le 5-BDBD (10  $\mu$ M) un antagoniste sélectif du récepteur P2X4. Le 5-BDBD (10  $\mu$ M) n'a pas toujours induit un blocage de la réponse à l' $\alpha\beta$ meATP. L'amplitude moyenne de la réponse  $\alpha\beta$ meATP (100  $\mu$ M) en présence de 5-BDBD (10  $\mu$ M) était de  $27,2 \pm 5,2$  % (n=63). Un blocage total de la réponse  $\alpha\beta$ meATP (100  $\mu$ M) a été observé dans 30,2% (n=63) des cellules et une inhibition de la réponse dans 49,2% des cellules (n=63). Si on combine les blocs et les inhibitions induites par le 5-BDBD (10  $\mu$ M), on peut conclure que 79,4% (50/63) des cellules testées expriment des récepteurs P2X4.

L'activité des récepteurs P2X4 est potentialisée par l'ivermectine (IVM) qui agit comme un modulateur allostérique positif (Illes et al., 2021) et un inhibiteur de l'internalisation des récepteurs P2X4 (Toulmé et al., 2006). La Figure 39B illustre le cas d'une cellule dans laquelle l' $\alpha\beta$ meATP (100  $\mu$ M) a induit une réponse de très faible amplitude. En présence d'IVM (5  $\mu$ M) l'amplitude de la réponse est fortement augmentée et ceci de manière réversible. Sur un ensemble de 21 cellules testées avec l'IVM (5 $\mu$ M) nous avons observé l'«apparition» d'une réponse à l' $\alpha\beta$ meATP (100  $\mu$ M) dans 66,7% (14/21) alors qu'elle n'était pas détectable en

condition «contrôle» c'est-à-dire en absence d'IVM. Par ailleurs dans 9,5% des cas (2/21) nous avons observé une forte potentialisation réversible d'une réponse à l' $\alpha\beta$ meATP (100  $\mu$ M) de faible amplitude en absence d'IVM (Figure 39B).

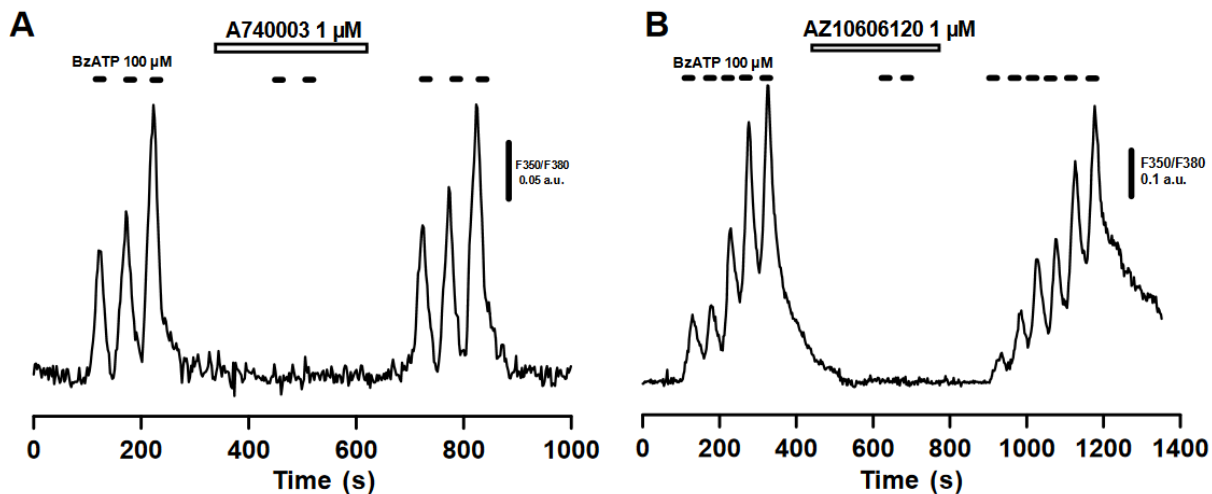


*Figure 39 : Récepteur P2X4, effet de l' $\alpha\beta$ meATP (100  $\mu$ M) seul et en présence de 5-BDBD (10 $\mu$ M)(A) et d'ivermectine (5 $\mu$ M) (B)*

En résumé, un effet potentialisateur de l'IVM (5  $\mu$ M) a été observé dans 76,2 % (16/21) des cellules. Cette proportion est comparable à celle de la proportion de cellules dans lesquelles le 5-BDBD (10  $\mu$ M) a inhibé les réponses  $\alpha\beta$ meATP (100  $\mu$ M), c'est-à-dire 79,4% (n=63).

**Récepteurs P2X7** : Le BzATP (100  $\mu\text{M}$ ) est souvent considéré comme un agoniste spécifique des récepteurs P2X7 (Illes et al., 2021) quelle que soit l'espèce animale considérée. Néanmoins, la littérature scientifique montre que le BzATP peut activer une grande diversité de récepteurs P2X (voir Figure 33 pEC<sub>50</sub> agonistes et (Illes et al., 2021)) et que ces récepteurs ont une forte affinité pour le BzATP (Illes et al., 2021). Il est fort probable qu'à une concentration de 100  $\mu\text{M}$ , le BzATP désensibilise ces récepteurs et n'active que les récepteur P2X7 qui ont une faible affinité pour le BzATP et ne présentent pas de désensibilisation (Illes et al., 2021).

La Figure 40 montre que des applications rapprochées (toutes les 50 s) de BzATP (100  $\mu\text{M}$ ) induit une augmentation progressive de la réponse. Ce phénomène désigné sous le terme de «run-up» est caractéristique des réponses P2X7. Dans nos expériences ces réponses au BzATP (100  $\mu\text{M}$ ) ont été complètement et réversiblement bloquées par des antagonistes sélectifs des récepteurs P2X7, à savoir l'A740003 (1  $\mu\text{M}$ ) (n = 53)(Figure 40A) et l'AZ10606120 (1  $\mu\text{M}$ ) (n=53) (Figure 40B). La proportion globale de cellules répondant à une application de BzATP 100  $\mu\text{M}$  était de 95,7% (154/161), indiquant que la quasi-totalité des cellules expriment des récepteurs P2X fonctionnels.



*Figure 40 : Effet de l'application répétée de BzATP (100 $\mu\text{M}$ ) sur les  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  des cellules BV-2 en présence de A740003 (1 $\mu\text{M}$ )(A) et de AZ10606120 (1 $\mu\text{M}$ )(B)*



### VI.1.7 Présence de récepteurs P2X5 et P2X1/5 fonctionnels sur les cellules BV-2.

Les données de la littérature concernant l'expression des ARNm des sous-unités P2X dans les cellules microgliales primaires et les cellules BV-2 indiquent la présence de P2X5 et de P2X1 (Calovi, Mut-Arbona et Sperlágh, 2019). Par ailleurs, il est documenté que ces sous-unités peuvent former des récepteurs hétéromériques (P2X1/5) caractérisés par une très forte affinité (nM) pour l'ATP (Torres et al., 1998) (Surprenant et al., 2000). Nous avons donc cherché à mettre en évidence ces récepteurs dans nos cultures de cellules BV-2.

Nous avons mis à profit le fait que les récepteurs P2X5 sont les seuls à être activés par le GTP extracellulaire (Wildman et al., 2002).

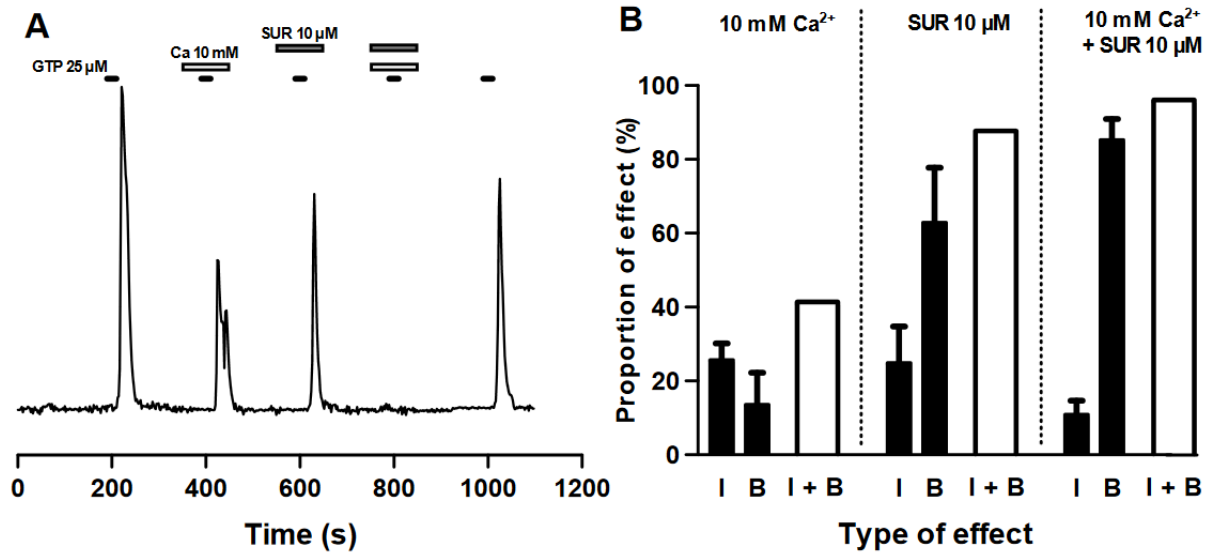
Contexte et hypothèse expérimentale : Malheureusement, l'affinité des récepteurs P2X1/5 et P2X5 de souris ne sont pas connus, mais chez le rat le GTP active les récepteurs rP2X5 avec un  $EC_{50}$  de 25  $\mu$ M, sans avoir d'effet agoniste sur les récepteurs rP2X1 (Haines et al., 1999) (Wildman et al., 2002). De plus l'élévation de la concentration extracellulaire de  $Ca^{2+}$  à 10 mM inhibe le récepteur rP2X5 mais pas le récepteur rP2X1 (Haines et al., 1999) (Wildman et al., 2002). De manière intéressante, une concentration extracellulaire de 10 mM de  $Ca^{2+}$  potentialise les récepteurs rP2X1/5 contrairement au récepteur homomérique rP2X5 qui est inhibé par le  $Ca^{2+}$  extracellulaire (Haines et al., 1999). Un autre outil intéressant est la suramine (SUR) qui inhibe à la fois les récepteurs rP2X1, rP2X5 et rP2x1/5 avec des  $IC_{50}$  de l'ordre de 1  $\mu$ M ((Wildman et al., 2002).

Nous avons donc décidé de tester ces caractéristiques sur les récepteurs P2Xs de souris exprimés par les cellules BV-2.

### VI.1.8 Présence et propriétés des réponses au GTP dans les cellules BV-2

L'application de GTP (25  $\mu$ M) a induit une augmentation de la  $[Ca^{2+}]_i$  dans 48,6% des cellules testées (n=208) (Figure 41 A). Cette réponse au GTP (25  $\mu$ M) était partiellement inhibée par le  $Ca^{2+}$  extracellulaire à une concentration de 10 mM et par la suramine (10  $\mu$ M). L'application de suramine (10 $\mu$ M) en présence de 10 mM de  $Ca^{2+}$  extracellulaire induit un blocage total et

réversible de la réponse au GTP (25  $\mu$ M). La Figure 41 B, illustre un exemple des effets du  $Ca^{2+}$  extracellulaire et de la suramine sur l'amplitude de la réponse au GTP (25  $\mu$ M).



*Figure 41* : Propriétés des réponses au GTP par les cellules microgliales BV-2. (A) Exemple de réponse obtenu après application de GTP (25 $\mu$ M), en présence ou non de  $Ca^{2+}$  (10mM) et de suramine (10 $\mu$ M). (B) représentation graphique du % de cellules répondant au GTP (25  $\mu$ M) en présence de  $Ca^{2+}$  (10mM) et/ou de suramine (10 $\mu$ M) Moyenne  $\pm$  s.e.m.

En ne considérant que les cellules qui ont répondu au GTP on obtient les résultats suivants (n=97):

Type d'effet	Ca <sup>2+</sup> extracellulaire 10 mM	Suramine 10 µM	Ca <sup>2+</sup> extracellulaire 10 mM + suramine 10 µM
Bloc (B)	13,6 ± 8,6 %	62,9 ± 14,8 %	85,3 ± 5,6 %
Inhibition (I)	25,7 ± 4,4 %	24,9 ± 9,8 %	10,9 ± 3,7 %
B+I	39,3 %	87,8 %	96,2 %

*N.B. Les chiffres indiquent l'amplitude relative des réponses au GTP par rapport à l'amplitude de la réponse avant l'application des substances, normalisée à 100%.*

En rapportant ces chiffres à la population totale (incluant les cellules ne répondant pas au GTP) on obtient les valeurs suivantes (n = 208) :

Type d'effet	Ca <sup>2+</sup> extracellulaire 10 mM	Suramine 10 µM	Ca <sup>2+</sup> extracellulaire 10 mM + suramine 10 µM
Bloc (B)	8,1 ± 6,1 %	30,6 ± 8,6 %	42,0 ± 2,3 %
Inhibition (I)	12,7 ± 3,2 %	12,0 ± 4,4 %	6,0 ± 2,2 %
B+I	20,8 %	42,6 %	48,0 %

Ces données indiquent qu'une sous-population (environ 50%) de cellules BV-2 exprime des récepteurs P2X5 et/ou P2X1/5 fonctionnels.

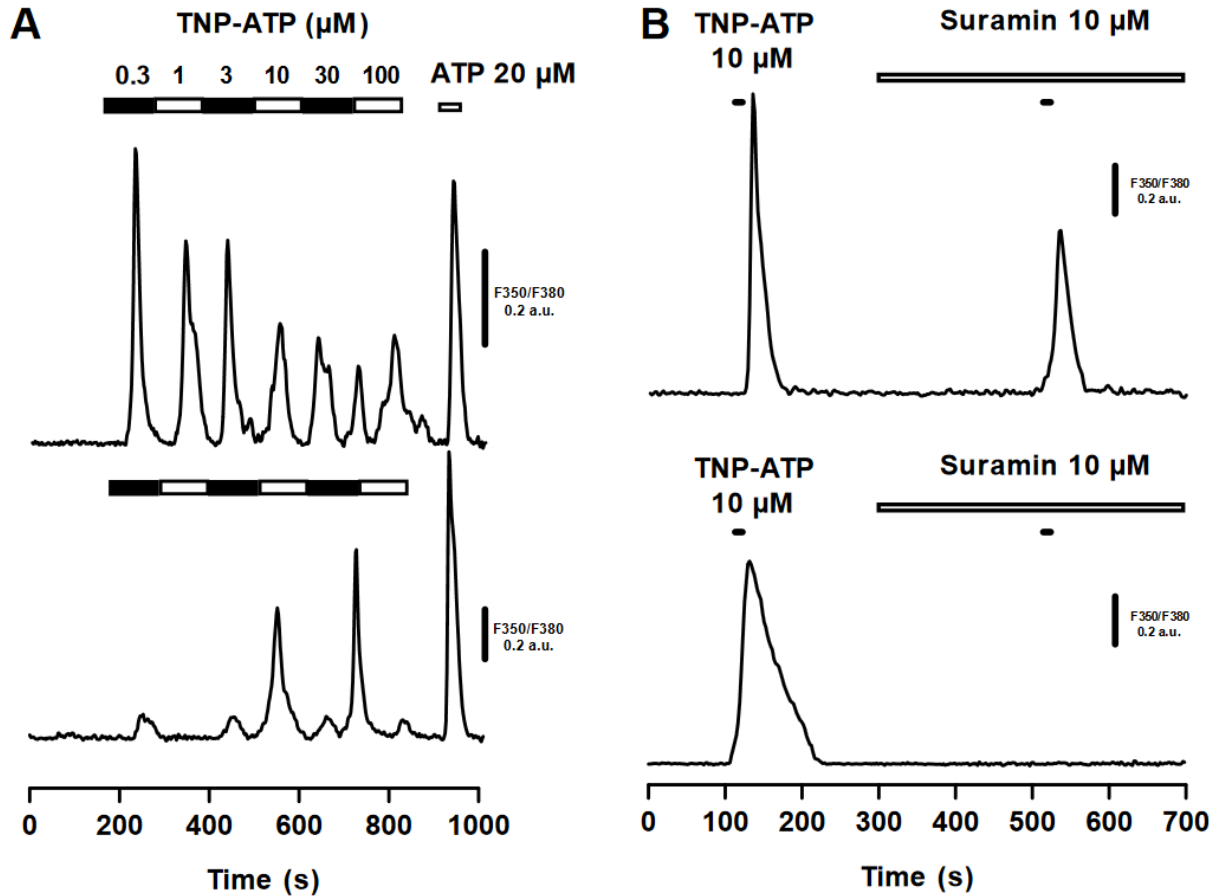
### VI.1.9 Effet du TNP-ATP sur la $[Ca^{2+}]_i$ .

Les récepteurs P2X1/5 de rat (rP2X1/5) sont d'une manière générale inhibés par le TNP-ATP, mais aux faibles concentrations le TNP-ATP appliqué seul induit un courant entrant (dépolarisant) en interagissant avec le récepteur P2X1/5 (Surprenant et al., 2000). Nous avons voulu voir si cela était également le cas pour les récepteurs P2X1/5 de souris exprimés par les cellules BV-2. Par conséquent, nous avons établi des relations concentration-réponse pour des concentrations croissantes cumulées de TNP-ATP (Figure 42 A). La Figure 42 A, montre deux traces issues de cellules différentes aux mêmes concentrations cumulées de TNP-ATP. La réponse au TNP-ATP est transitoire et ne se maintient pas en plateau malgré l'application continue de TNP-ATP à la même concentration pendant 100s. Cet effet d'augmentation de la  $[Ca^{2+}]_i$  est donc un phénomène transitoire qui ne s'observe qu'au début de chaque changement de concentration de TNP-ATP. De plus, on constate que ce ne sont pas forcément les plus faibles concentrations qui donnent les plus petites réponses et que l'application de forte concentration de TNP-ATP n'induit pas nécessairement des réponses de grande amplitude.

Du point de vue quantitatif, on note par exemple que 47,6% (10/21) des cellules ont répondu au TNP-ATP (10  $\mu$ M).

De plus cette réponse propre induite par le TNP-ATP (10  $\mu$ M) seul est inhibée dans 25% (n=8) ou bloquée par la suramine (10  $\mu$ M) dans 75 % (n=8) des cellules testées (Figure 42 B).

L'ensemble de ces données indique qu'environ la moitié des cellules exprime des récepteurs P2X1/5 fonctionnels.



*Figure 42* : Effet du TNP-ATP sur les  $[Ca^{2+}]_i$ . (A) Traces issues de cellules BV-2 différentes. En fonction de la cellule la réponse au TNP-ATP sera différente. (B) Effet de la suramine (10 $\mu$ M) sur la réponse TNP-ATP (10 $\mu$ M).

#### VI.1.10 Interactions fonctionnelles entre les récepteurs P2Xs présents dans les cellules BV-2

Durant nos expériences nous avons quelquefois testé l'application séquentielle et cumulée de 2 antagonistes sur des réponses à des agonistes. Les résultats obtenus suggèrent que certains récepteurs P2X interagissent fonctionnellement et modulent de manière rapide et souvent réciproquement leur activité.

#### VI.1.11 5-BDBD et TNP-ATP

Ainsi en présence de 5-BDBD (10  $\mu$ M) (antagoniste des récepteurs P2X4), l'addition de TNP-ATP (10  $\mu$ M) potentialise la réponse à l' $\alpha\beta$ meATP 100  $\mu$ M : l'amplitude moyenne de la réponse  $\alpha\beta$ meATP 100  $\mu$ M en condition 5-BDBD (10  $\mu$ M) par rapport à la condition contrôle (sans antagoniste) était de 27,9 %  $\pm$  5,2 % alors qu'en 5-BDBD (10  $\mu$ M) + TNP-ATP (10  $\mu$ M) elle était de 63,7  $\pm$  11,4 % (n=63). Ces valeurs sont significativement différentes ( $p = 2 \cdot 10^{-4}$ , test de Student apparié).

Ces résultats indiquent qu'en présence de 5-BDBD, le TNP-ATP (10  $\mu$ M) potentialise la réponse à l' $\alpha\beta$ meATP (100  $\mu$ M).

#### VI.1.12 Suramine et 5-BDBD

En présence de suramine (10  $\mu$ M), l'addition de 5-BDBD (10  $\mu$ M) n'a pas eu d'effet significatif sur la réponse à une faible concentration BzATP (5  $\mu$ M) : la réponse à 5  $\mu$ M de BzATP était de 31,8  $\pm$  3,7 % (n = 41) en Suramine (10  $\mu$ M) et de 27,  $\pm$  3,6 % (n = 51) en Suramine (10  $\mu$ M) + 5BDBD (10  $\mu$ M) ( $p = 0.37$ , test de Student non apparié). Ceci nous a paru surprenant car nous avons vu précédemment que le 5-BDBD (10  $\mu$ M) inhibait la réponse à l' $\alpha\beta$ meATP (100  $\mu$ M) ce qui indiquait clairement la présence de récepteurs P2X4 fonctionnels. Par ailleurs, la suramine n'inhibe pas significativement le récepteur P2X4 de souris (Figure 34  $pIC_{50}$ ). Nous avons donc répété l'expérience sur des cultures prétraitées pendant 24h avec du LPS (25 ng/mL), une condition connue pour augmenter le temps de séjour des récepteurs P2X4 à la membrane plasmique. Après traitement au LPS, la suramine seule a induit une forte potentialisation de la réponse au BzATP (5  $\mu$ M) : réponse en condition contrôle (sans suramine) : 44, 3  $\pm$  4,1 % (n = 42) ; réponse en suramine (10  $\mu$ M) : 70,3  $\pm$  4,4 % (n = 40). Cette réponse au BzATP (5  $\mu$ M) potentialisée en suramine (10  $\mu$ M) était significativement inhibée par le 5-BDBD (10  $\mu$ M). La réponse au BzATP (5  $\mu$ M) était de 60,9  $\pm$  5,5 % (n = 4) en Suramine (10  $\mu$ M) et de 27,  $\pm$  3,6 % (n = 51) en Suramine (10  $\mu$ M) + 5BDBD (10  $\mu$ M) ( $p = 0.011$ , test de Student non apparié). Ces données suggèrent que la suramine révèle (ou potentialise) une réponse au BZATP (5  $\mu$ M) inhibée par le 5-BDBD et implique donc des récepteurs P2X4.

### VI.1.13 BBG et A740003

Nous avons également testé l'effet du Brilliant Blue G (BBG) dans certaines expériences destinées à caractériser la présence de récepteurs P2X7. Dans ces expériences, le récepteur P2X7 était activé par le BzATP à une concentration de 100  $\mu\text{M}$  en présence d'un cocktail d'antagonistes composé de 5-BDBD (10  $\mu\text{M}$ ) et de TNP-ATP (10  $\mu\text{M}$ ). Dans ces conditions, la réponse BzATP (100  $\mu\text{M}$ ) était soit entièrement bloquée (52,2% des cas) ou fortement inhibée (31,9 % des cas) (n=69) par le A740003 (1  $\mu\text{M}$ ) un antagoniste sélectif des récepteurs P2X7.

Le BBG est également classiquement décrit comme un antagoniste des récepteurs P2X7 (Donnelly-Roberts et Jarvis, 2007) et nous avons voulu tester son effet dans les mêmes conditions expérimentales. Le BBG (10  $\mu\text{M}$ ) a bloqué la réponse BzATP (100  $\mu\text{M}$ ) dans seulement 4,8% (n = 62) des cellules et à inhibé la réponse dans 27,4% des cellules (n = 62). Par contre, et contrairement au A740003, le BBG a potentialisé la réponse BzATP (100  $\mu\text{M}$ ) dans 25,8 % des cellules (n = 62). Dans ce contexte, il faut noter que pour les récepteurs humains le BBG est, à forte affinité, antagoniste des récepteurs P2X5 ( $EC_{50} = 0.5 \mu\text{M}$ ) (Bo et al., 2003) et à une faible affinité, antagoniste pour le récepteur P2X7 ( $EC_{50} > 100 \mu\text{M}$ ) (Donnelly-Roberts et Jarvis, 2007).

***L'ensemble de ces interactions fonctionnelles entre récepteurs sera abordé plus en détail dans la section «Discussion» de notre manuscrit de thèse et considéré dans une perspective physiologique et pathologique.***

En conclusion, nos résultats indiquent clairement que les cellules microgliales murines BV-2 expriment des récepteurs fonctionnels de type P2X, à savoir P2X1, P2X1/5, P2X3, P2X4, P2X5 et P2X7. En particulier, nous montrons que les sous-unités P2X1, P2X3 et P2X5 qui n'avaient été décrites qu'en termes d'expression d'ARNm forment des récepteurs fonctionnels dans les cellules BV-2 dans nos conditions de culture.

VI.1.14 Effets de prétraitement des cultures avec du LPS ou de l'IL-4 sur  
l'expression fonctionnelle des récepteurs P2X.

Il est bien établi que l'induction d'un état pro-inflammatoire, par exemple suite à un traitement au LPS, engendre des changements morphologiques et fonctionnels dans les cellules microgliales primaires et dans les cellules BV-2 (voir chapitre «Introduction»). Nous avons voulu savoir si les réponses induites par les différents agonistes que nous avons testé étaient changées suite à un traitement par du LPS (25 ng/mL, 24h) (état pro-inflammatoire) ou suite à un traitement par l'IL-4 (20 ng/mL, 24h) (phénotype anti-inflammatoire).

Les données obtenues sont résumées dans le tableau ci-dessous. Il faut noter que tous les agonistes (sauf l'ADP) ont été testés en condition «LPS» mais pas en condition «IL-4» (cases grisées).

	CONTRÔLE		LPS		IL-4	
	%	N/Ntot	%	N/Ntot	%	N/Ntot
<b>αβmeATP 1 μM</b>	<b>22,2</b>	50/225	<b>44,2</b>	112/253	<b>6,9</b>	2/29
<b>αβmeATP 100 μM</b>	<b>60,7</b>	106/175	<b>10</b>	10/99	<b>24</b>	7/22
<b>BzATP 5 μM</b>	<b>73,6</b>	52/71	<b>92</b>	23/25		
<b>BzATP 100 μM</b>	<b>95,7</b>	154/161	<b>93,9</b>	31/33		
<b>ATP 1 μM</b>	<b>49,4</b>	123/149	<b>63,6</b>	91/143	<b>79,5</b>	31/39
<b>ATP 20 μM</b>	<b>94,2</b>	467/496	<b>99</b>	211/213	<b>100</b>	39/36
<b>ADP 20 μM</b>	<b>54,35</b>	25/46				
<b>GTP 25 μM</b>	<b>46,6</b>	97/208	<b>50</b>	8/16		
<b>UTP 20 μM</b>	<b>87,8</b>	36/41	<b>100</b>	118/118		

Avec **N** : nombre de cellules présentant une réponse à l'agoniste ; **Ntot** : nombre total de cellules testées.

Nous avons ensuite effectué des comparaisons statistiques entre les proportions de cellules présentant des réponses à un agoniste donné. Ces comparaisons ont été effectuées 2 à 2 pour les 3 conditions testées : Contrôle, LPS et IL-4.



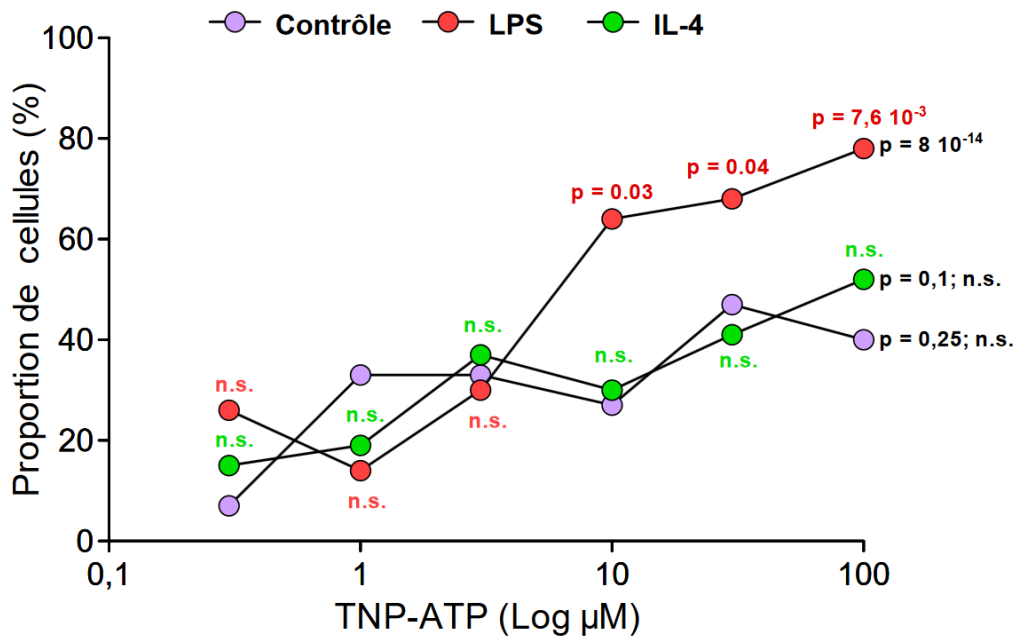
Les résultats des comparaisons statistiques (test du  $X^2$ ) sont consignés dans le tableau ci-dessous :

	LPS/Ctrl	IL-4/Ctrl	IL-4/LPS
<b><math>\alpha\beta</math>meATP 1 <math>\mu</math>M</b>	<b><math>3,7 \cdot 10^{-7}</math></b>	<b>0,054</b>	<b>0,054</b>
<b><math>\alpha\beta</math>meATP 100 <math>\mu</math>M</b>	<b><math>4,6 \cdot 10^{-16}</math></b>	<b>0,01</b>	<b><math>8 \cdot 10^{-3}</math></b>
<b>BzATP 5 <math>\mu</math>M</b>	<b>0,05</b>		
<b>BzATP 100 <math>\mu</math>M</b>	<b>0,67</b>		
<b>ATP 1 <math>\mu</math>M</b>	<b><math>6,4 \cdot 10^{-3}</math></b>	<b>0,66</b>	<b>0,062</b>
<b>ATP 20 <math>\mu</math>M</b>	<b><math>1,7 \cdot 10^{-3}</math></b>	<b>0,01</b>	<b>0,5</b>
<b>ADP 20 <math>\mu</math>M</b>			
<b>GTP 25 <math>\mu</math>M</b>	<b>0,79</b>		
<b>UTP 20 <math>\mu</math>M</b>	<b><math>1 \cdot 10^{-3}</math></b>		

Les chiffres sont les valeurs de  $p$  obtenues en effectuant un test de  $X^2$ . Les cases bleues indiquent les différences statistiquement significatives, les cases grises foncées indiquent les différences non significatives.

#### VI.1.15 Réponses propres au TNP-ATP.

Nous avons également caractérisé les effets des prétraitements au LPS et à l'IL-4 sur la proportion de cellules exprimant des réponses propres au TNP-ATP. Pour cela nous avons construit des courbes concentration-réponse pour des concentrations de TNP-ATP allant de 0,3  $\mu$ M à 100  $\mu$ M. Les résultats sont illustrés dans la figure 44.



*Figure 44*: Courbe concentration réponse de l'effet propre du TNP-ATP en conditions Contrôle, LPS (25 ng/mL) et IL-4 (20 ng/ml).

Un test de  $\chi^2$  pour chaque condition sur les proportions de cellules répondant aux différentes concentrations de TNP-ATP ( $n=6$ ) montre qu'il n'y a pas de différences significatives pour la condition «Contrôle» ( $p = 0,25$ ,  $n=6$ ) et la condition «IL-4» ( $p = 0,1$ ,  $n=6$ ). Par contre, pour la condition «LPS», on note une différence significative ( $p = 8 \cdot 10^{-14}$ ,  $n=6$ ) due aux points correspondant aux concentrations  $\geq 10 \mu\text{M}$ . En effet, si on refait un test de  $\chi^2$  pour chaque valeur de concentration entre la condition contrôle et la condition «LPS» ou «IL-4», on note qu'il n'y a pas de différence pour les valeurs de TNP-ATP  $< 10 \mu\text{M}$  et que la différence pour la condition «LPS» est visible pour des concentrations  $\geq 10 \mu\text{M}$  (voir Figure 44 pour les valeurs de significativité).

## VI.2 Identification du récepteur sensible au calcium dans la lignée microgliale BV-2

Les cellules microgliales sont les principales cellules immunitaires du système nerveux central. Elles surveillent constamment leur environnement pour détecter les signes d'infection, de lésions ou de toute autres perturbations. Pour explorer leur environnement, elles utilisent leurs prolongements cytoplasmiques. Cela leur permet de s'explorer la composition du milieu extracellulaire mais également de se déplacer dans le tissu cérébral, de phagocyter les débris cellulaires ou des agents pathogènes potentiels et de communiquer avec d'autres types cellulaires présents dans le système nerveux central.

L'activité de ces cellules microgliales est régie par une variété de signaux tels que les cytokines, les neurotransmetteurs ou encore des protéines non conformes (mal repliées ou agrégées) comme par exemple les protéines  $\beta$  amyloïdes dans le cas de la maladie d'Alzheimer. D'autres substances peuvent impacter le devenir des microglies. Par ailleurs un brusque changement de la concentration ionique extracellulaire va recruter ces cellules par chimiotaxie et les activer.

Le calcium joue un rôle clé dans l'organisme en tant que signal physiologique. Le calcium intracellulaire est utilisé comme un second messager parce qu'il peut facilement être mobilisé par des canaux à la membrane plasmique ou en le libérant à partir de réservoirs intracellulaires (réticulum endoplasmique, lysosomes).

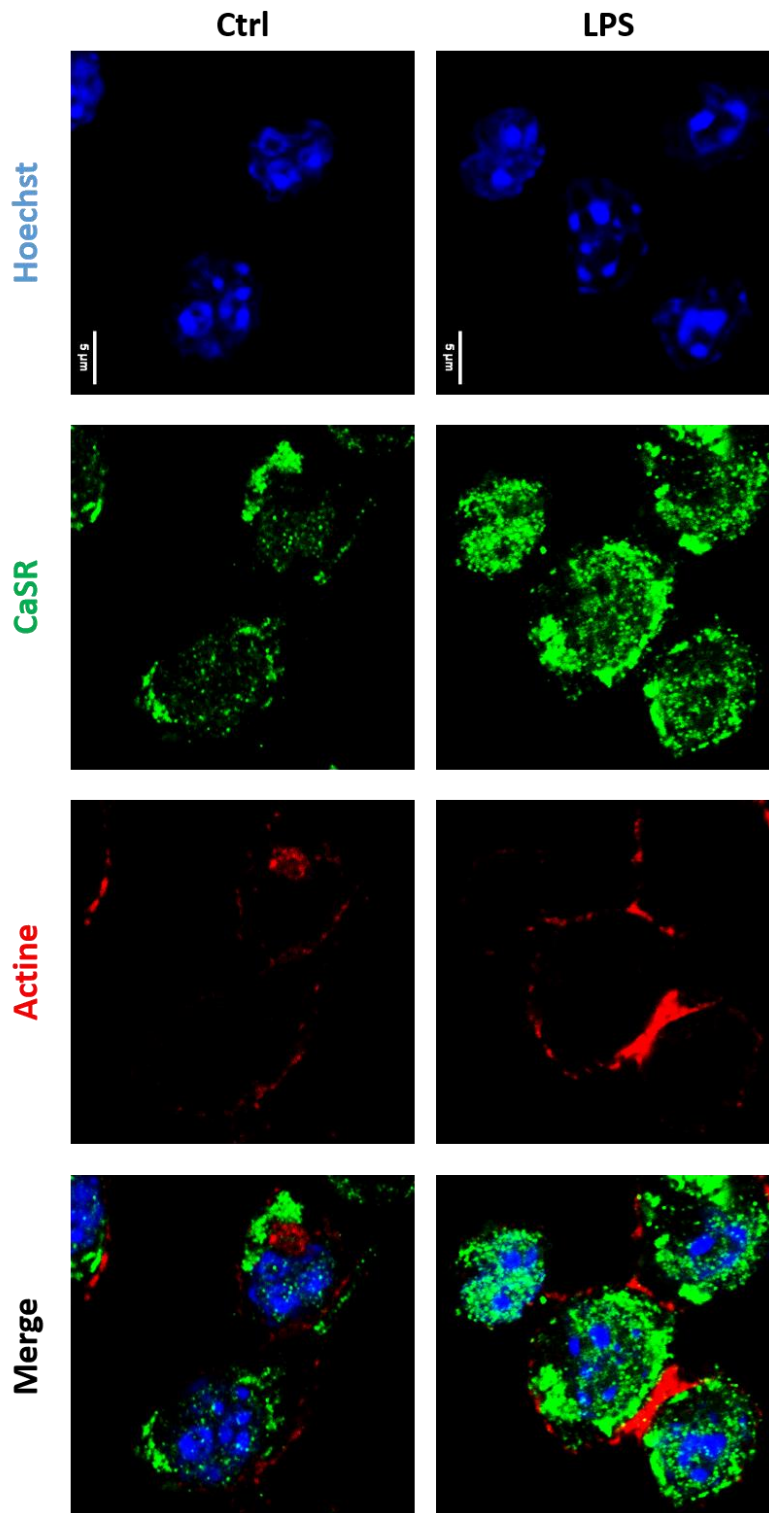
La concentration extracellulaire de  $Ca^{2+}$  est également importante pour diverses fonctions cellulaires, telles que l'excitabilité neuronale, la contraction musculaire ou la coagulation sanguine. Il est donc évident qu'un dérèglement de la concentration de calcium extracellulaire va avoir des impacts négatifs sur les cellules. Des niveaux excessifs de calcium extracellulaire provoquent une surcharge calcique (hypercalcémie avec un niveau anormalement élevé de calcium dans le sang, par exemple), une inflammation, la mort cellulaire par apoptose ou par nécrose. Un taux élevé de calcium extracellulaire peut également causer des dommages structurels tels que la rupture de la membrane plasmique et la perméabilisation des membranes lysosomales et mitochondriales. D'un autre côté, si les niveaux de calcium sont trop bas, cela va perturber l'homéostasie cellulaire car les processus qui dépendent d'une concentration adéquate de calcium extracellulaire ne peuvent plus fonctionner. Par exemple, après activation des récepteurs canaux P2X, si la concentration extracellulaire en calcium est dérégulée, leur

signalisation sera défectueuse. En effet, certains récepteurs canaux P2X, comme le récepteur P2X7 sont inhibés lorsque la concentration extracellulaire en calcium est trop importante (Yan et al., 2011). De même, si elle est trop faible, l'entrée de calcium dans la cellule, après activation des récepteurs-canaux P2X ne sera pas suffisante pour activer les différentes voies de signalisations intracellulaires calcium dépendantes. Dans le système nerveux central, des niveaux de calcium extracellulaire anormaux peuvent entraîner un dysfonctionnement microglial, suite à l'induction d'une neuroinflammation, et cela va contribuer à l'initiation et à la progression des pathologies du système nerveux central (Foster, 2007).

Une question importante pour la régulation de la concentration extracellulaire du calcium est de savoir comment les variations extracellulaires de la concentration de  $Ca^{2+}$  sont détectées.

En 1993, Brown et al., ont décrit un récepteur sensible au calcium extracellulaire qui s'est avéré être présent dans l'ensemble du règne animal et végétal. Ce récepteur a été nommé «Calcium-sensing Receptor» (Brown et al., 1993). Chez les mammifères, le CaSR présente une expression ubiquitaire. Il est présent en périphérie où son implication dans diverses fonctions physiologiques et pathologiques est maintenant bien établie. Il est également exprimé dans le SNC. Les données de la littérature indiquent qu'il est exprimé par les neurones, les oligodendrocytes, les astrocytes (Bandyopadhyay, Tfelt-Hansen et Chattopadhyay, 2010). Son expression dans les cellules microgliales, n'a été mentionné qu'occasionnellement et de façon anecdotique dans seulement 2 articles de la littérature scientifique internationale. Par conséquent, on connaît très peu de choses concernant son expression et son rôle dans les cellules microgliales dans les conditions physiologiques et pathologiques.

Dans ce contexte, nous avons recherché la présence du CaSR sur les cellules BV-2. Notre modèle de culture de cellules BV-2, permet en effet, et ceci dans des conditions parfaitement contrôlées, de déterminer la fonctionnalité du CaSR en utilisant la technique d'imagerie du  $Ca^{2+}$  libre intracellulaire, de caractériser les changements phénotypiques par des approches de biologie moléculaire (immunomarquage, dosage de cytokine) et d'évaluer les changements morphologiques induits notamment par les agonistes ou antagonistes du CaSR.

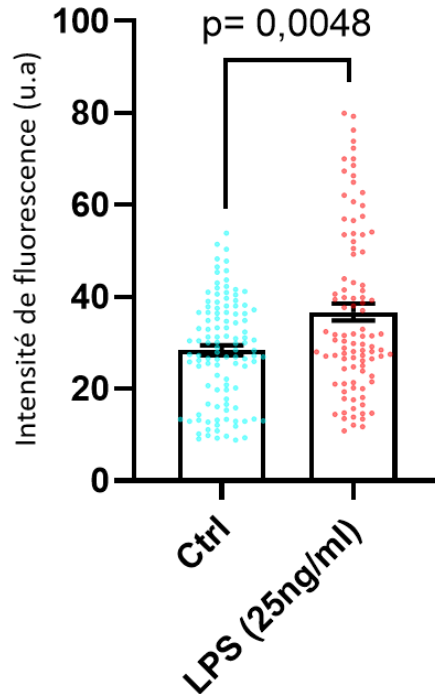


*Figure 45 : Image de microscopie confocale de cellules BV-2. Le noyau est marqué avec la sonde Hoechst (bleu), l'actine grâce à la phalloïdine atto 647-N (rouge), et le CaSR en vert. Barre d'échelle : 5µm*

## VI.2.1 Présence fonctionnelle du CaSR dans la lignée microgliale BV-2 :

### VI.2.1.1 Présence du CaSR dans la lignée BV-2, intensité totale.

La figure 45 montre des images obtenues après marquage du CaSR dans des cultures de cellules BV-2, en conditions «contrôle» (état quiescent) et traitée au LPS (25ng/ml pendant 24h). On note, la présence d'une immunoréactivité spécifique avec l'anticorps anti-CaSR suggérant que ce récepteur est bien exprimé par les cellules microgliales BV-2. Après quantification de l'intensité totale de fluorescence (Figure 46), on note qu'il est plus exprimé après activation des cellules par le LPS. En effet, pour des cellules non traitées, l'intensité de fluorescence moyenne est de  $28,39 \pm 1,077$  u.a. (unités arbitraires) (n=112) et pour les BV-2 activées de  $36,67 \pm 1,833$  u.a. (n=97) ( $p=0,0048$  test de Mann Whitney).

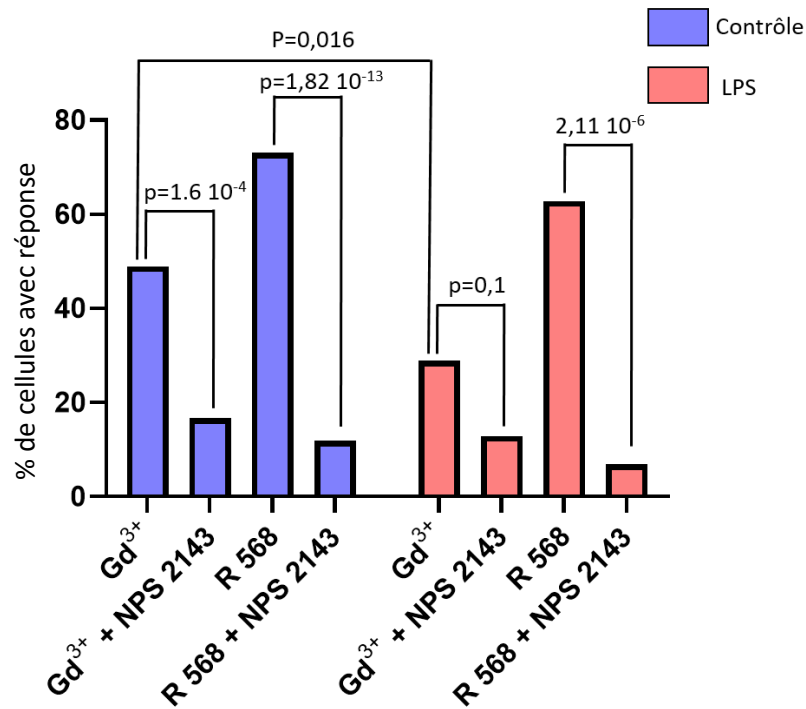


*Figure 46 : Histogramme représentant l'intensité de fluorescence pour le marquage du CaSR (u.a.) de cellules BV-2 contrôles ou traitées au LPS (25ng/ml) pendant 24h. (p valeur exacte, Test de Mann Whithney).*

### VI.2.1.2 Fonctionnalité du CaSR dans la lignée microgliale BV-2 :

Pour évaluer la fonctionnalité du CaSR dans nos cellules nous avons utilisé l'imagerie du calcium libre intracellulaire avec la sonde Fura-2. Les cellules ont été stimulées pendant 50 secondes avec du  $Gd^{3+}$  ( $50\mu M$ ) ou du R568 ( $5\mu M$ ) en présence ou en absence de NPS 2143 ( $5\mu M$ ), un modulateur allostérique négatif du CaSR. Dans les expériences avec le NPS 2143 ( $5\mu M$ ), ce dernier a été pré appliqué pendant deux minutes avant d'appliquer le cocktail agoniste et antagoniste.

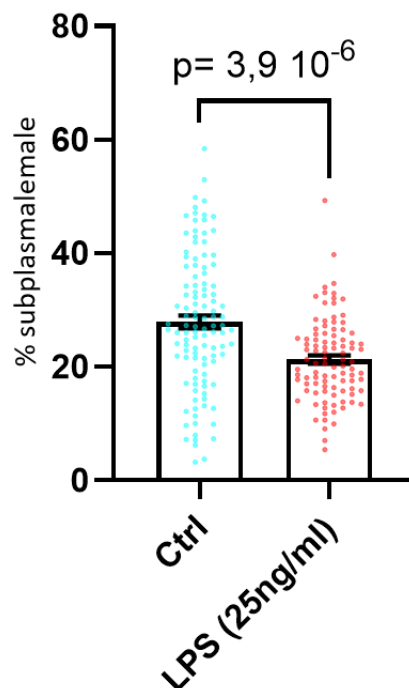
Sur la figure 47, on observe que les cellules «contrôle» ou traitées au LPS répondent à une application de  $Gd^{3+}$  ( $50\mu M$ ) ou de R568 ( $5\mu M$ ) mais dans des proportions différentes : «contrôle » ( $48,88\%$  ( $88/180$ )); « LPS » ( $28,89\%$  ( $13/45$ )). La proportion de cellules répondant au  $Gd^{3+}$  dans la condition contrôle est supérieure à la condition LPS ( $p=0,016$ , test du  $\chi^2$ ). Lorsque ces cellules sont stimulées avec du R568 ( $5\mu M$ , 50s),  $73,12\%$  ( $68/93$ ) des cellules répondent dans la condition «contrôle» et  $62,79\%$  ( $27/43$ ) des cellules dans la condition « LPS » ( $p=0,22$ , test du  $\chi^2$ ).



**Figure 47 :** Histogramme représentant la proportion de cellules BV-2 répondant (augmentation du  $[Ca^{2+}]_i$ ) à divers agonistes ( $\pm$  antagoniste). L'application d'agonistes ( $Gd^{3+}50\mu M$  ou R-568  $5\mu M$ ) augmente la  $[Ca^{2+}]_i$  et l'effet est inhibé par le NPS2143 ( $5\mu M$ ). (p valeurs exactes, test du  $\chi^2$ ).

Ces réponses ( $Gd^{3+}$  ou R568) sont inhibées par le NPS 2143 (5  $\mu M$ ), que ce soit en condition «contrôle» ou «LPS». Pour le  $Gd^{3+}$  on passe de 48,88% (88/180) à 16,67% (7/42) ( $p=0,00014$  test du  $\chi^2$ ) pour la condition «contrôle» et de 28,89% (13/45) à 12,90% (4/31) ( $p=0,10$  test du  $\chi^2$ ) pour la condition «LPS». De même pour le R568, on passe de 73,12% (68/93) à 11,86% (7/59) ( $p=1,82 \cdot 10^{-13}$ , test du  $\chi^2$ ) pour la condition «contrôle» et de 62,79% (27/43) à 6,89% (2/29) ( $p=2,11 \cdot 10^{-6}$ , test du  $\chi^2$ ) pour la condition «LPS».

Ces résultats semblent être opposés à ceux obtenus après quantification des marquages immunocytochimique du CaSR (voir ci-dessus, Figure 46) ou une augmentation de l'immunoréactivité avait été observée suite au traitement par le LPS. Néanmoins lorsqu'on effectue une analyse plus fine de l'expression du CaSR, présenté dans la figure 48, l'expression membranaire du CaSR est diminuée en condition «LPS» bien que la quantité totale (dans la cellule entière) augmente. Dans les régions membranaires et juste sous-membranaires l'intensité de l'immunoréactivité passe de  $27,90\% \pm 1,127\%$  u.a. en condition «contrôle» à  $21,29\% \pm 0,7401\%$  u.a ; en condition «LPS» ( $p=3,9 \cdot 10^{-7}$ , t-test non apparié).

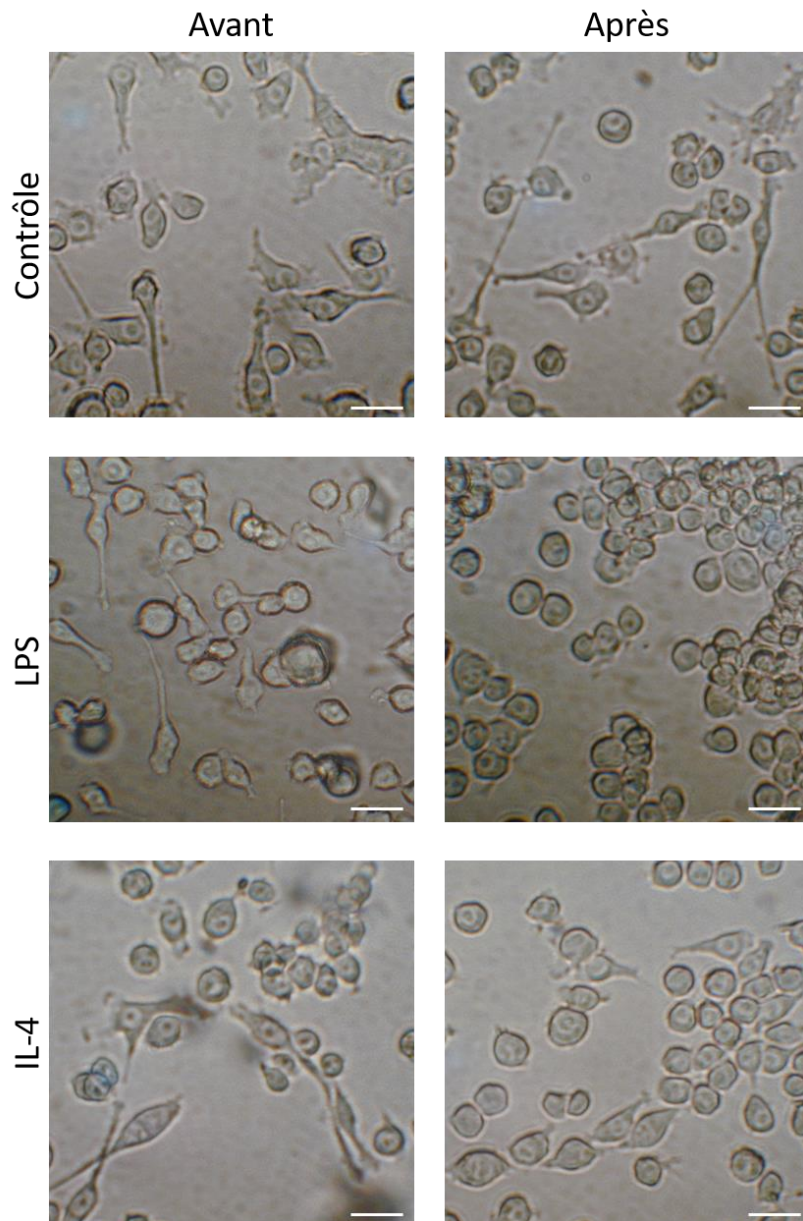


**Figure 48 :** Histogramme du % de CaSR exprimé dans la région subplasmalemmale de cellules BV-2 « contrôles » ou traitées au LPS. ( $p$  valeur exacte, t-test non apparié).



### VI.2.2 Modulation du CaSR et changements morphologiques des cellules BV-2

Dans un premier temps nous avons testé l'effet de plusieurs substances utilisées pour induire des phénotypes pro-ou anti-inflammatoires sur les changements morphologiques des cellules BV-2. Pour le phénotype pro-inflammatoire les cellules BV-2 sont incubées avec 25ng/ml de LPS pendant 24h et pour le phénotype anti-inflammatoire avec de 20 ng/ml d'IL-4 pendant 24h (Lively et Schlichter, 2018).



*Figure 49 : Image de microscopie de cellules BV-2, Avant traitement et après 24h de traitement. Contrôle : changement de milieu ; LPS : 25ng/ml ; IL-4 : 20ng/ml. Barre d'échelle : 10 $\mu$ m.*

La figure 49, illustre un résultat typique pour ces trois conditions. Avant traitement on observe une proportion équivalente de cellules allongées et rondes. Après traitement on remarque que le LPS induit un changement morphologique alors que le changement de milieu seul, ou l'ajout d'IL-4 n'ont pas d'effet apparent. La figure 50 illustre la quantification des résultats sous forme du changement dans le ratio de cellules allongées sur le nombre total de cellules après traitement. Sans traitement le ratio est de  $0,48 \pm 0,012$  (n=34), avec le LPS il est de  $0,137 \pm 0,013$  (n=27) et avec l'IL-4 de  $0,457 \pm 0,055$  (n=4). Le traitement avec le LPS (25ng/ml) diminue significativement la proportion de cellules allongées par rapport à la condition contrôle ( $p=7,8 \cdot 10^{-28}$ , test du  $\chi^2$ ) alors que l'IL-4 (20ng/ml) n'a pas d'effet significatif sur la proportion de cellules BV-2 allongées ( $p=0,5$ , test du  $\chi^2$ ).

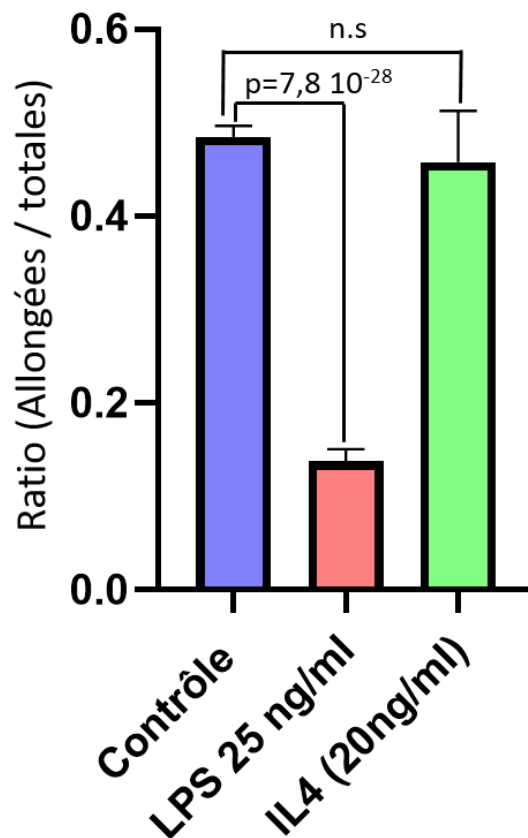
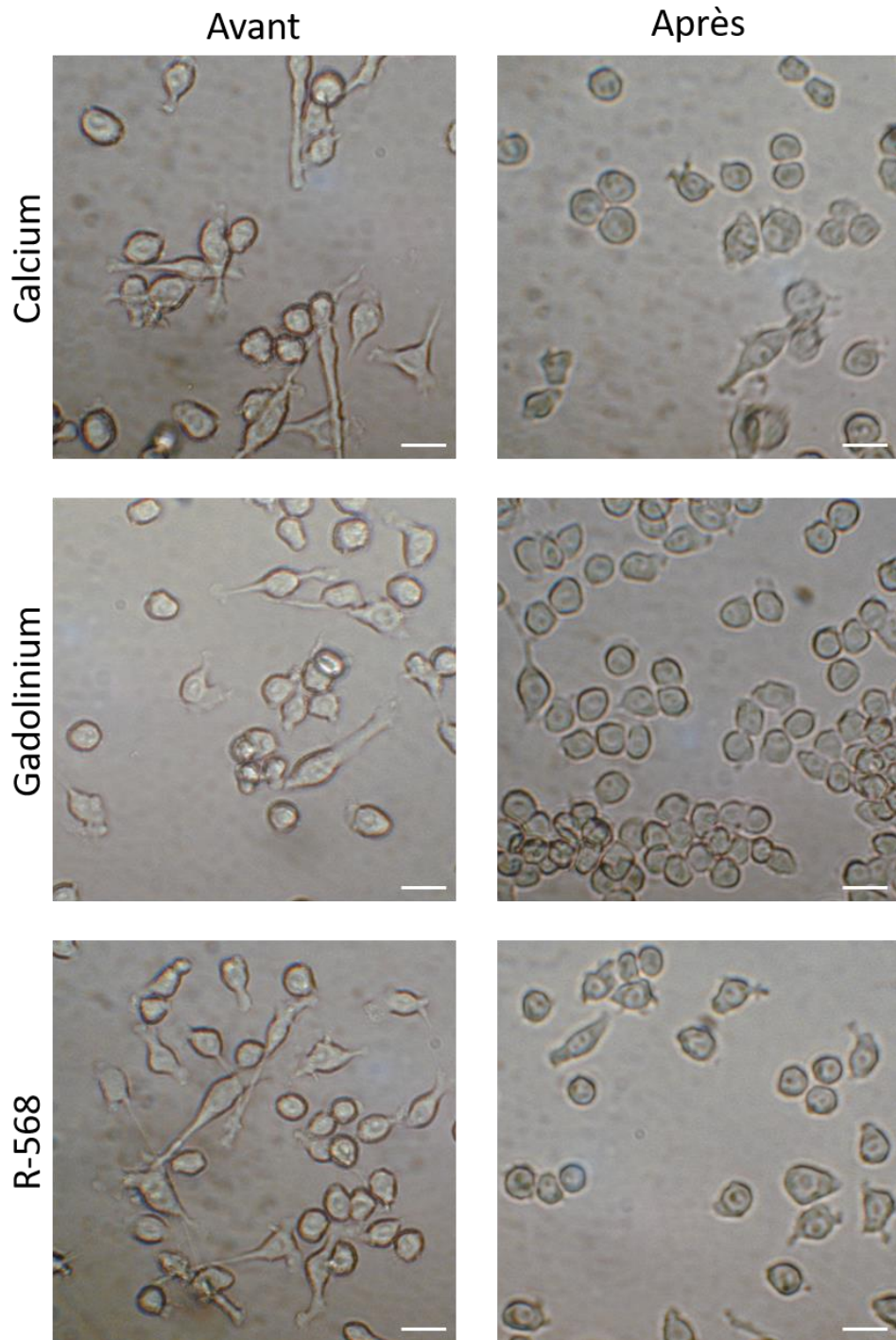


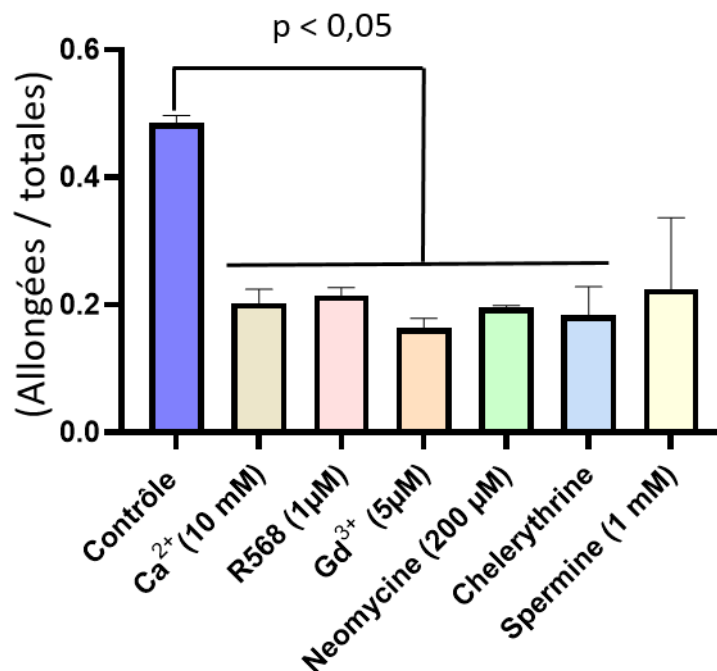
Figure 50: Histogramme représentant le ratio de cellules BV-2 allongées sur total, pour la condition contrôle (changement de milieu), LPS (25ng/ml) et IL-4 (20ng/ml) pendant 24h. (p valeurs exactes, test du  $\chi^2$ )

Si les cellules BV-2 sont traitées pendant 24h avec des agonistes du CaSR ( $\text{Ca}^{2+}$  10mM,  $\text{Gd}^{3+}$  5 $\mu\text{M}$  ou NPS-R568 1 $\mu\text{M}$ ), on observe que les cellules adoptent une ronde (Figure 51).

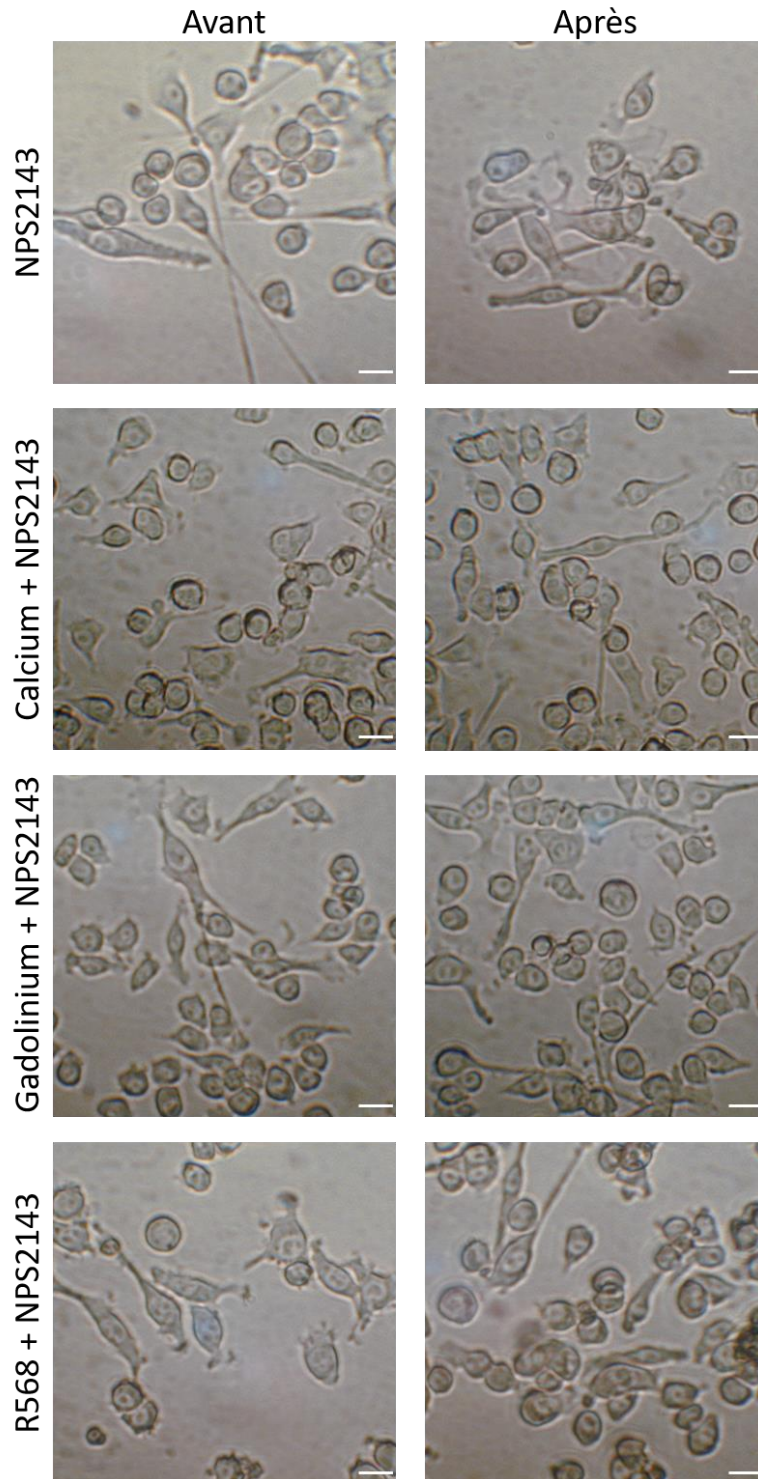


*Figure 51* : Image de microscopie de cellules BV-2, Avant traitement et après 24h de traitement. Calcium : 10 mM ; Gadolinium : 5 $\mu\text{M}$  ; R-568 : 1 $\mu\text{M}$ . Barre d'échelle : 10 $\mu\text{m}$

La figure 52 illustre la quantification des ratios cellules allongées sur nombre total de cellules ( $A/N_{tot}$ ) dans les différentes conditions testées. Lorsque la concentration de calcium extracellulaire est augmentée de 1,8 mM à 10mM, le ratio  $A/N_{tot}$  est de  $0,2 \pm 0,021$  ( $n=11$ ), ce qui est significativement différent de la situation « contrôle » (1,8 mM de calcium extracellulaire) ( $p=0,023$ , test du  $\chi^2$ ). Le R568 (1 $\mu$ M) diminue significativement la proportion de cellules allongées ( $A/N_{tot} = 0,214 \pm 0,012$ ) ( $n=16$ ) par rapport à la condition « contrôle » ( $p=4,35 \cdot 10^{-19}$ , test du  $\chi^2$ ). Il en est de même pour le  $Gd^{3+}$  (5 $\mu$ M) ( $A/N_{tot} = 0,163 \pm 0,0153$ ) ( $n=3$ ) ( $p=1,17 \cdot 10^{-5}$ , test du  $\chi^2$ ), la néomycine (200 $\mu$ M) ( $A/N_{tot} = 0,1957 \pm 0,003$ ) ( $n=3$ ) ( $p=5,7 \cdot 10^{-22}$ , test du  $\chi^2$ ) et la chélerythrine (10 $\mu$ M) ( $A/N_{tot} = 0,18 \pm 0,045$ ) ( $n=4$ ) ( $p=4,9 \cdot 10^{-3}$ , test du  $\chi^2$ ). Seul le traitement avec la spermine (1 mM) n'augmente pas significativement la proportion de cellules rondes par rapport à la condition « contrôle », bien qu'une tendance semble exister ( $A/N_{tot} = 0,225 \pm 0,11$ ) ( $n=3$ ) ( $p=0,145$ , test du  $\chi^2$ ).

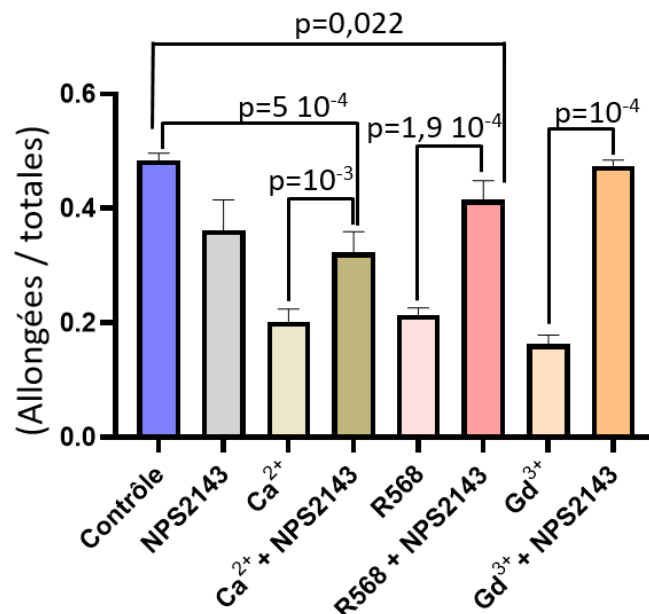


*Figure 52 : Histogramme représentant le ratio de cellules BV-2 allongées sur total, pour la condition contrôle (changement de milieu) et divers agoniste CaSR (24h de traitement). (Test du  $\chi^2$ )*



*Figure 53 : Image de microscopie de cellules BV-2, Avant traitement et après 24h de traitement. Les cellules sont traitées avec un cocktail d'agoniste (Calcium (10mM) ou  $Gd^{3+}$  (5 $\mu$ M) ou R568 (1 $\mu$ M) et d'antagoniste NPS2143 1 $\mu$ M Barre d'échelle : 10 $\mu$ m*

La Figure 53 illustre que les effets des antagonistes du CaSR sont inhibés par le NPS2143. La quantification est représentée sur la figure 54. Il faut noter que le NPS2143 induit à lui seul une diminution significative du ratio  $A/N_{\text{tot}}$  ( $0,362 \pm 0,052$ ) ( $n=3$ ) ( $p=7,9 \cdot 10^{-3}$ , test du  $\chi^2$ ). Pour les cellules traitées avec du  $\text{Ca}^{2+}$  (10mM) ou du R568 (1 $\mu\text{M}$ ), l'ajout de l'antagoniste NPS 2143 (1 $\mu\text{M}$ ) inhibe le changement morphologique observé suite au traitement. Cependant, on note pour la condition « $\text{Ca}^{2+}$  (10mM) + NPS 2143 (1 $\mu\text{M}$ )» ( $n=3$ ) que le ratio de  $0,323 \pm 0,035$  est significativement différent de celui dans la condition  $\text{Ca}^{2+}$  10mM seul ( $p=10^{-3}$  test du  $\chi^2$ ), mais que ce ratio ne revient pas à une valeur comparable à celle observée en condition «contrôle» ( $p=5 \cdot 10^{-4}$ , test du  $\chi^2$ ). De même, pour le R568 (1 $\mu\text{M}$ ) + NPS 2143 (1 $\mu\text{M}$ ) ( $n=9$ ), l'antagoniste bloque partiellement le changement morphologique,  $A/N_{\text{tot}} = 0,415 \pm 0,033$ , ce qui est significativement différent du R568 (1 $\mu\text{M}$ ) seul ( $p=1,9 \cdot 10^{-4}$ , test du  $\chi^2$ ) mais aussi du contrôle ( $p=0,022$ , test du  $\chi^2$ ). Seul l'effet du  $\text{Gd}^{3+}$  (1 $\mu\text{M}$ ) est entièrement bloqué par le NPS 2143 (1 $\mu\text{M}$ ). En effet, en présence de  $\text{Gd}^{3+}$  + NPS3143 ( $n=3$ ), le ratio  $A/N_{\text{tot}}$  est de  $0,474 \pm 0,01$ , ce qui est significativement différent du ratio dans la condition « $\text{Gd}^{3+}$  seul» ( $p=10^{-4}$ , test du  $\chi^2$ ), mais pas différent du «contrôle» ( $p=0,81$ , test du  $\chi^2$ ).

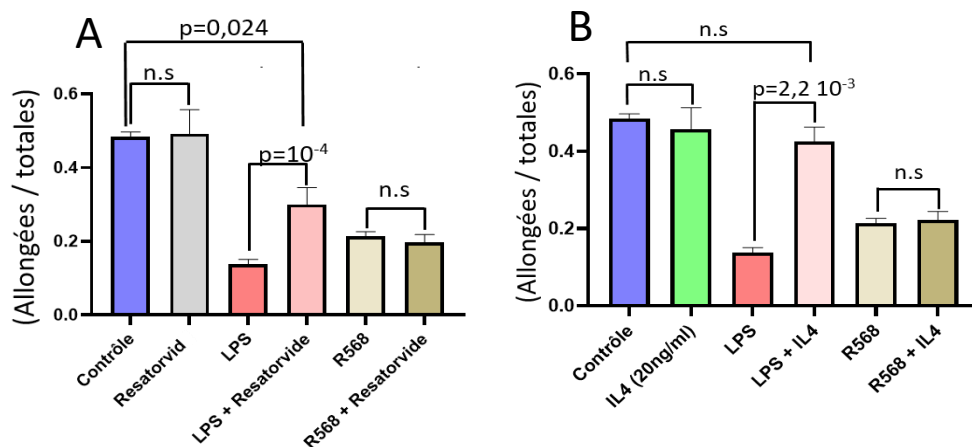


**Figure 54 :** Histogramme représentant le ratio de cellules BV-2 allongées sur total. Le traitement pendant 24h agoniste + antagoniste du CaSR augmente le ratio de cellules allongées. ( $p$  valeurs exactes, test du  $\chi^2$ ).

### VI.2.3 Effet de deux anti-inflammatoires sur le changement morphologique induit par le LPS ou le R 568

Etant donné que le LPS et les agonistes du CaSR produisent des effets similaires sur la morphologie des cellules BV-2, nous voulions tester l'hypothèse d'une interaction entre les récepteurs ou voies de signalisation des récepteurs TLR4 et CaSR. Pour cela, nous avons testé les effets du Résatorvid (Tak-242), un antagoniste des récepteurs TLR-4 et l'IL-4, une cytokine anti-inflammatoire connue pour contrer les effets du LPS (Lively et Schlichter, 2018).

Les figures 55 A et 55 B, illustrent que le Résatorvid seul (50nM) (n=4) ( $A/N_{\text{tot}} = 0,492 \pm 0,065$ ) et l'IL-4 seule (20ng/ml) (n=4) ( $A/N_{\text{tot}} = 0,457 \pm 0,055$ ) ne produisent pas de changement significatif du ratio  $A/N_{\text{tot}}$  par rapport à la condition «contrôle». En revanche une co-incubation de LPS (25ng/ml) avec du Résatorvid (50ng/ml) (n=4) ( $0,3 \pm 0,046$ ) ou de l'IL-4 (20ng/ml) (n=4) ( $A/N_{\text{tot}} = 0,42 \pm 0,037$ ) augmente la proportion de cellules allongées par rapport au LPS (25ng/ml) (Résatorvid :  $p=10^{-4}$ ; IL-4 :  $p=2,2 \cdot 10^{-3}$ , test du  $\chi^2$ , par rapport au LPS seul). Néanmoins, il faut remarquer que, même si la proportion de cellules allongées augmente en résatorvid, elle ne revient pas au niveau de la condition «contrôle» pour le Résatorvid ( $p=0,024$ , test du  $\chi^2$ ). Par contre, pour l'IL-4 on observe un blocage total de l'effet du LPS, et le ratio  $A/N_{\text{tot}}$  n'est pas significativement différent de celui observé en condition «contrôle» ( $p=0,126$ , test du  $\chi^2$ ).



**Figure 55 :** Effet de deux anti-inflammatoires (IL4 et resatorvid) sur la proportion de cellules BV-2 allongées. (A) Le résatorvid augmente la proportion de cellules allongées et contre partiellement l'effet du LPS, mais n'a pas d'effet sur le R568. (B) l'IL-4 bloque totalement les effets du LPS mais n'a pas d'effet sur le R568. (p valeurs exactes, test du  $\chi^2$ ).

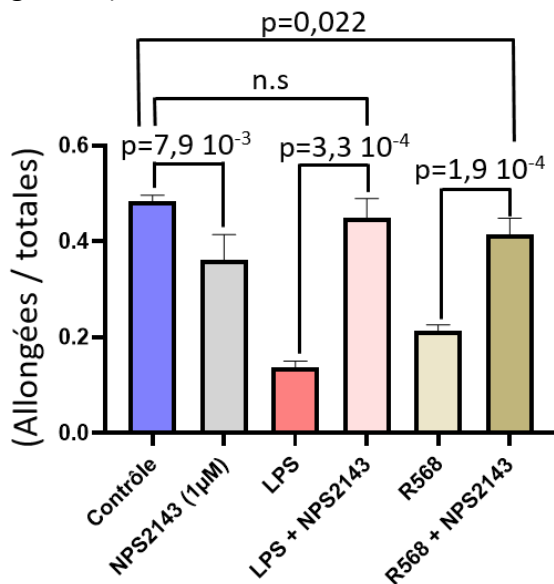
Une observation importante est que ni le résatorvid (n=3), ni l'IL-4 (n=4) affectent le changement morphologique induit par le R568 ( $0,198 \pm 0,02$  et  $0,222 \pm 0,022$  respectivement ;  $p=0,586$  et  $p=0,86$  lorsque comparés au R568 seul, test du  $\chi^2$ ).

#### VI.2.4 Effet du NPS 2143 sur le changement morphologie des cellules BV-2 induit par le LPS ou le R568

Nous avons ensuite évalué, l'effet du NPS 2143 ( $1\mu\text{M}$ ) sur la réponse induite par le LPS ( $25\text{ng/ml}$ ).

La figure 56 montre que le NPS 2143 ( $1\mu\text{M}$ ) inhibe effectivement les changements morphologiques induits par le du R 568 (comme décrit précédemment. mais on observe toujours une différence significative par rapport à la condition «contrôle» (cellules non traitées) ( $p=0,022$ , test du  $\chi^2$ ).

De manière inattendue et intéressante, le NPS 2143 ( $1\mu\text{M}$ ) a bloqué les changements morphologiques induits par le LPS ( $A/N_{\text{tot}} = 0,45 \pm 0,41$ ) (n=6) ( $p=3,3 \cdot 10^{-4}$ , test du  $\chi^2$ ). De plus ce blocage est complet car la valeur du ratio  $A/N_{\text{tot}}$  en condition «LPS + NPS2143» n'est pas significativement différente de celle observée dans des conditions « contrôle » ( $p=0,294$ , test du  $\chi^2$ ) (Figure 56).



*Figure 56: Effet du NPS-2143 sur la proportion de cellules BV-2 allongées. Le NPS 2143 inhibe les changements morphologiques induits par le LPS ou le R568. (p valeurs exactes, test du  $\chi^2$ ).*

Ces résultats montrent que le LPS est capable d'induire une activation du CaSR, probablement de manière indirecte par transactivation du CaSR par TLR4 ou par une interaction entre les voies de signalisation de ces deux récepteurs.

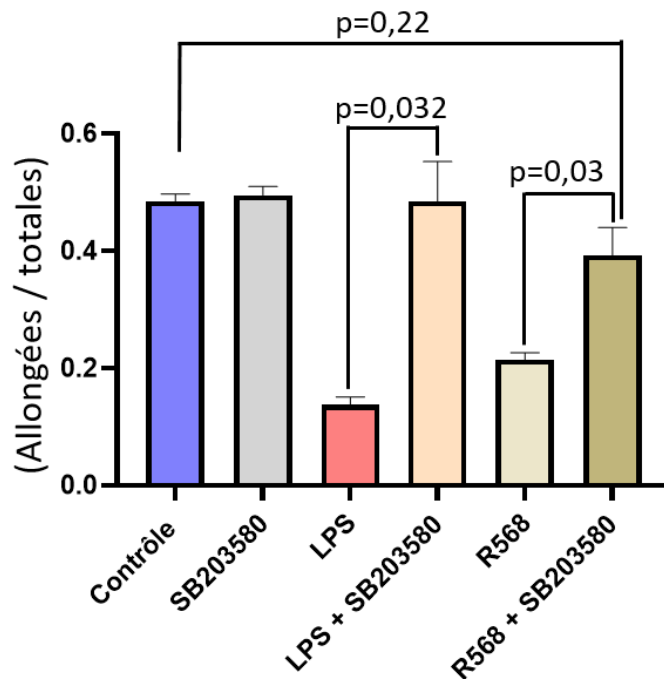


### VI.3 Changement morphologique et voies intracellulaires

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à la voie p38 qui fait partie de la voie des MAP kinases, et qui peut potentiellement être activée par le récepteur TLR-4 ou le CaSR. Dans ce but, nous avons testé l'effet du SB203580 (5  $\mu$ M), un antagoniste sélectif de p38.

Le SB203580 (5 $\mu$ M) seul ne produit pas de changement morphologique des cellules BV-2 ( $A/N_{\text{tot}} = 0,49 \pm 0,015$ ) (n=4) ( $p=0,98$ , test du  $\chi^2$ ) (Figure 57).

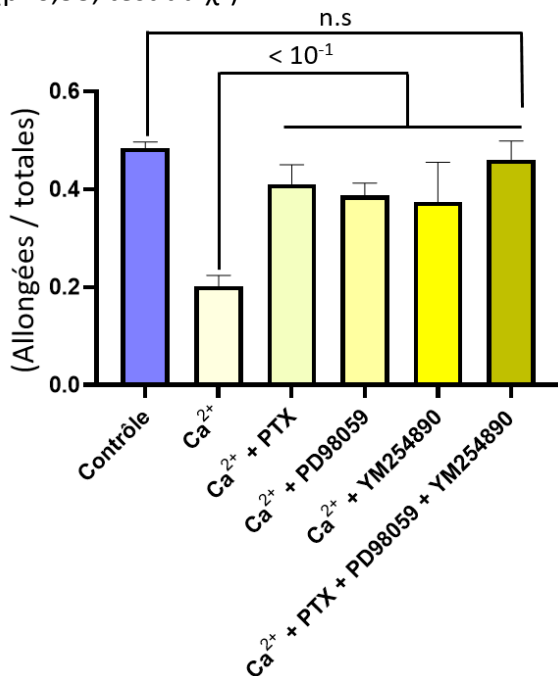
Le SB203580 bloque totalement l'effet du LPS (25 ng/ml) et celui du R568 (1 $\mu$ M) : LPS (n=4):  $A/N_{\text{tot}} = 0,484 \pm 0,067$  ;  $p=0,032$  test du  $\chi^2$ ; R568 (n=4):  $A/N_{\text{tot}} = 0,39 \pm 0,047$  ;  $p=0,03$ , test du  $\chi^2$  (lorsque comparés au LPS ou R568 seul) et revient au niveau de la condition «contrôle» ( LPS :  $p=0,99$ , test du  $\chi^2$ ) (R568 :  $p=0,22$ , test du  $\chi^2$ ). Les données sont représentées dans la Figure 57.



*Figure 57* : Effet du SB203580 (inhibiteur de p38) sur la proportion de cellules BV-2 allongées. Le SB203580 bloque les changements morphologiques induits par le LPS, mais n'inhibe que partiellement ceux du R568. ( $p$  valeurs exactes, test du  $\chi^2$ ).

Afin de caractériser plus en détail les voies de signalisations intracellulaires impliquées dans les effets du CaSR, nous avons testé les effets d'un prétraitement des cultures avec la toxine pertussique (PTX) pour bloquer la voie  $G_{i/o}$ , avec le PD98059 pour bloquer l'activité des MAP kinases et avec l'YM254890 pour bloquer la signalisation  $G_{q/11}$ . La stimulation du CaSR a été réalisée en augmentant la concentration de  $Ca^{2+}$  extracellulaire à 10 mM.

Après quantification, présentée dans la figure 58 on observe que pour la condition  $Ca^{2+}$  (10mM) + PTX (150 ng/ml) on obtient un ratio  $A/N_{tot}$  de  $0,41 \pm 0,039$  (n=4), qui est significativement différent de celui observé dans la condition  $Ca^{2+}$  (10mM) seul ( $p=4 \cdot 10^{-4}$ , test du  $\chi^2$ ) et proche du ratio de notre groupe « contrôle » ( $p=0,06$ , test du  $\chi^2$ ). Lors de la co-incubation  $Ca^{2+}$  (10mM) + PD98059 (20 $\mu$ M) on obtient un ratio  $A/N_{tot}$  de  $0,387 \pm 0,025$  (n=4), qui est significativement différent de celui de la condition  $Ca^{2+}$  (10mM) seul ( $p=5 \cdot 10^{-4}$ , test du  $\chi^2$ ) et du groupe « contrôle » ( $p=0,012$  test du  $\chi^2$ ). De même, pour la condition  $Ca^{2+}$  (10mM) + YM254890 (10 $\mu$ M) on observe un ratio  $A/N_{tot}$  de  $0,374 \pm 0,08$  (n=4), qui est significativement différent de celui en condition  $Ca^{2+}$  (10mM) seul ( $p=0,012$  test du  $\chi^2$ ). En revanche on a toujours significativement moins de cellules allongées par rapport à la condition contrôle ( $p=0,016$  test du  $\chi^2$ ). Lorsque les trois antagonistes sont ajoutés en même temps on bloque le changement morphologique induit par le  $Ca^{2+}$  (10mM) seul (ratio  $0,46 \pm 0,037$ ) (n=4) ( $p=1,7 \cdot 10^{-3}$ , test du  $\chi^2$ ) et on observe un ratio similaire au contrôle ( $p=0,53$ , test du  $\chi^2$ ).



*Figure 58: Effet de la PTX (inhibiteur  $G_{i/o}$ ), du PD98059 (inhibiteur MAP kinases) et de l'YM254890 (inhibiteur  $G_{q/11}$ ) sur les changements morphologiques induits par l'augmentation du  $Ca^{2+}$  (1,8 mM à 10 mM). Ajoutées séparément, ces molécules inhibent partiellement les changements morphologiques induits par le  $Ca^{2+}$  10 mM. Lorsque les 3 antagonistes sont ajoutées en même temps le changement morphologique est bloqué (plus de différence avec le « contrôle ») (test du  $\chi^2$ ).*

En résumé, une incubation avec des agonistes du CaSR va induire un changement morphologique des cellules microgliales BV-2, en diminuant la proportion de cellules allongées et en augmentant celle de cellules rondes. Cet effet est bloqué par le modulateur allostérique négatif du CaSR, le NPS 2143.

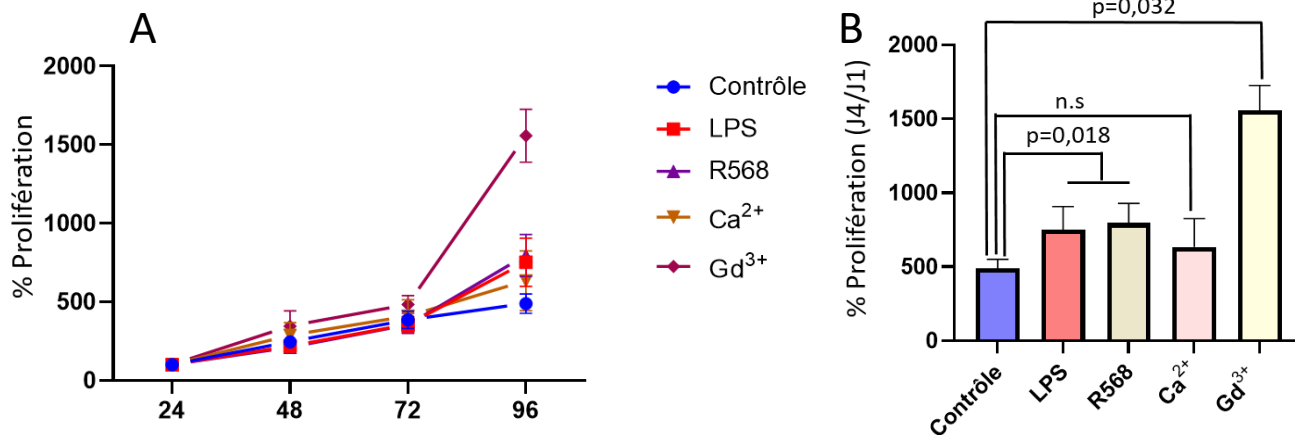
Le changement morphologique observé est similaire à celui observé à la suite d'une incubation avec du LPS (25 ng/ml) pendant 24h (Figure 50).

De plus, le changement morphologique induit par le LPS (25ng/ml) peut être bloqué par le NPS 2143 (1 $\mu$ M), alors que le changement morphologique induit par les agonistes du CaSR n'est pas bloqué par le résatorvid (50 nM), un antagoniste TLR-4, ni par l'IL-4 (20ng/ml), connu pour contrer la réponse inflammatoire initiée par le LPS.

#### VI.4 CaSR et prolifération cellulaire

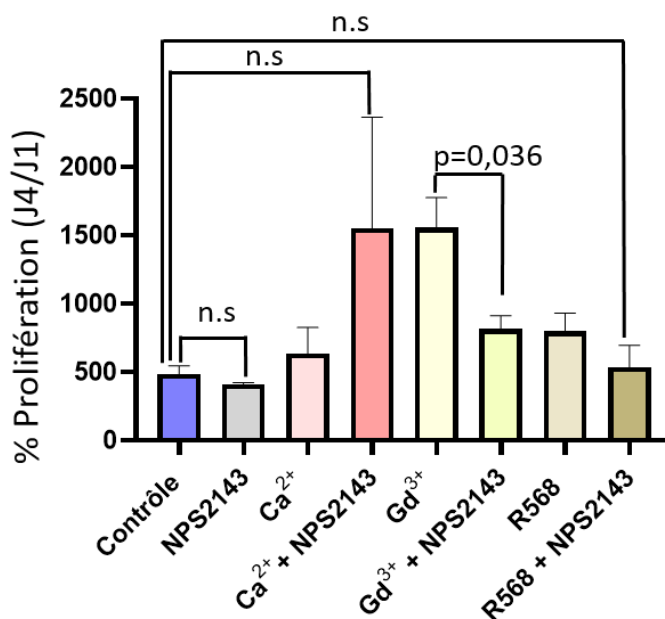
Le CaSR est un RCPG exprimé à la surface des cellules. Plusieurs études montrent son implication dans la division et la prolifération cellulaire (Diez-Fraile et al., 2013) dans certains tissus. Nous avons donc quantifié les effets de l'activation du CaSR sur la prolifération des cellules microgliales BV-2. La prolifération sur les trois premiers jours (sans traitement) est identique entre chaque condition, comme illustré sur la figure 59 A. En revanche ; après traitement (J4, 96h), on observe une augmentation significative de la prolifération cellulaire pour les cellules traitées avec du LPS (25ng/ml) (752,76%  $\pm$  153%) ( $p=0,018$ ,  $t$ -test non apparié), avec du R 568 (1 $\mu$ M) (795,9%  $\pm$  133,94%) ( $p=0,018$ ,  $t$ -test non apparié) ainsi qu'avec du Gd<sup>3+</sup> (5 $\mu$ M) (1557,71%  $\pm$  167,85%) ( $p=0,032$ ,  $t$ -test non apparié) par rapport à la condition «contrôle» (489,39%  $\pm$  61,46%) (Figure 59 A et B). Le Ca<sup>2+</sup> augmente également la prolifération cellulaire (634,92%  $\pm$  190,53%) mais n'est pas statistiquement différent de la condition « contrôle » ( $p=0,32$   $t$ -test non apparié) (voir Figure 59).

L'incubation avec le NPS 2143 (1 $\mu$ M) seul n'a pas d'effet sur la prolifération cellulaire (441,9%  $\pm$  10,81%) par rapport à nos cellules BV-2 « contrôle » ( $p=0,73$ ,  $t$ -test non apparié) (voir figure 60).



**Figure 59 :** Prolifération des cellules BV-2. (A) Représentation du % d'augmentation (J1 à J4) par rapport à J1 avec ajout des substances à 72h. (B) Histogramme du % de prolifération (J4/J1) en fonction des différents traitements. (*p* valeurs exactes, *t*-test non apparié).

Lors d'une co-incubation avec le NPS 2143 (1 $\mu$ M) (Figure 60), l'augmentation de la prolifération cellulaire induite par les agonistes du CaSR est inhibée. En effet pour le Gd<sup>3+</sup> (5 $\mu$ M), l'ajout de l'antagoniste NPS 2143 (1 $\mu$ M) bloque l'effet sur la prolifération cellulaire (815%  $\pm$  96,28%) (*p*=0,036 *t*-test non apparié) et la prolifération n'est plus différent de la condition «contrôle» (*p*=0,12 *t*-test non apparié). De même, lorsque le R 568 (1 $\mu$ M) est co-incubé avec le NPS 2143 (1 $\mu$ M) on diminue la prolifération cellulaire (535,4%  $\pm$  159,4%) (*p*=0,25 *t*-test non apparié) induite par le R 568, qui n'est plus différent de la condition «contrôle» (*p*=0,72 test du  $\chi^2$ ). Le NPS 2143 (1 $\mu$ M) n'a pas d'effet significatif sur la prolifération cellulaire, lorsqu'il est co-incubé avec du Ca<sup>2+</sup> (10mM) (1554%  $\pm$  809,1%) (*p*=0,1, *t*-test non apparié) si comparée au Ca<sup>2+</sup> (10mM)).



**Figure 60 :** Histogramme de l'effet du NPS2143 sur le % de prolifération (J4/J1) en fonction des différents traitements. (*p* valeurs exactes, *t*-test non apparié).

En résumé, le traitement des cellules microgliales BV-2 avec des agonistes du CaSR augmente la prolifération cellulaire, et cet effet est inhibé par le NPS 2143 (1 $\mu$ M) (Figure 60).

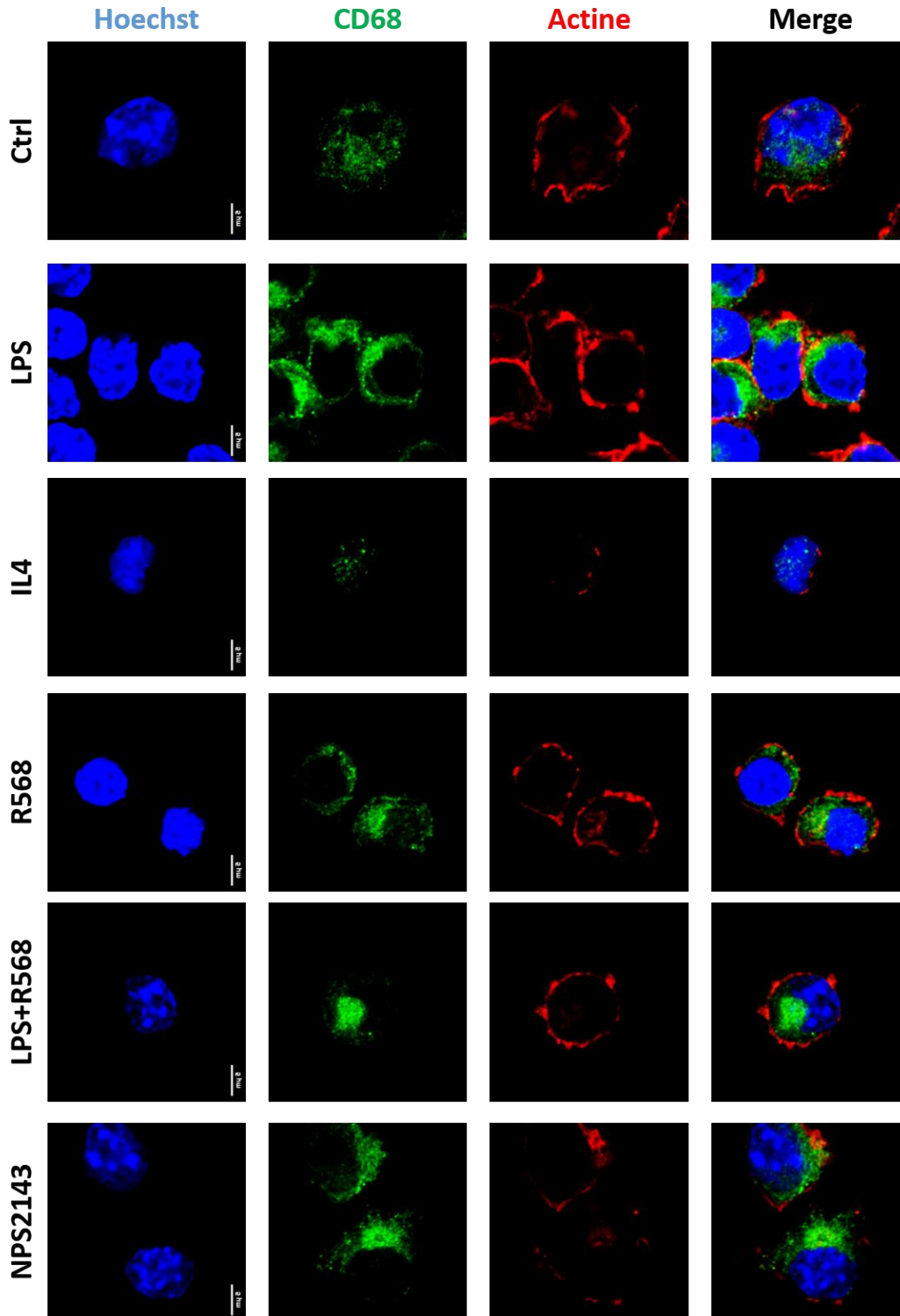
Concernant le Ca<sup>2+</sup> (10mM), on a toujours observé beaucoup de variabilité lors de nos expériences, limitant l'utilisation du Ca<sup>2+</sup> comme agoniste pour évaluer l'implication du CaSR. Cette variabilité pourrait être liée au changement de la force efficace des ions Ca<sup>2+</sup> à travers la membrane plasmique ce qui pourrait augmenter les influx de Ca<sup>2+</sup> par des canaux liés à des voies de transduction autres que celles du CaSR. L'utilisation d'agonistes (Gd<sup>3+</sup> par exemple) et de modulateurs allostériques positifs (R568 par exemple) qui sont plus «sélectifs» du CaSR aux concentrations utilisées permet de limiter en partie ce problème.

#### VI.5 CaSR et polarisation des cellules microgliales BV-2

L'activation du CaSR dans les cellules immunitaires périphériques module les phénomènes inflammatoires (Iamartino et Brandi, 2022). Par conséquent, nous nous sommes demandé si son activation sur les cellules microgliales BV-2 pouvait également impacter le phénotype de ces cellules. Nous avons donc incubé pendant 24h des cellules BV-2 avec, soit du R568 (1 $\mu$ M), soit du NPS2143 (1 $\mu$ M) pendant 24h puis réalisé des immunomarquages dirigés contre CD68, dont l'expression augmente en condition pro-inflammatoire, et contre CD206 qui est surexprimé en condition anti-inflammatoire.

Nous avons également évalué l'effet d'un traitement conjoint des cultures avec du R568 (1 $\mu$ M) et du LPS (25 ng/ml) pendant 24h.

Ces données ont été complétées avec des dosages de cytokine, grâce à un cytokine array.



*Figure 61* : Image de microscopie confocale de cellules BV-2. Le noyau est marqué avec la sonde Hoechst (bleu), l'actine grâce à la phalloïdine atto 647-N (rouge), et le CD68 en vert pour nos six conditions (Contrôle, LPS, IL-4, R568, NPS2143, LPS + R568). Barre d'échelle : 5µm

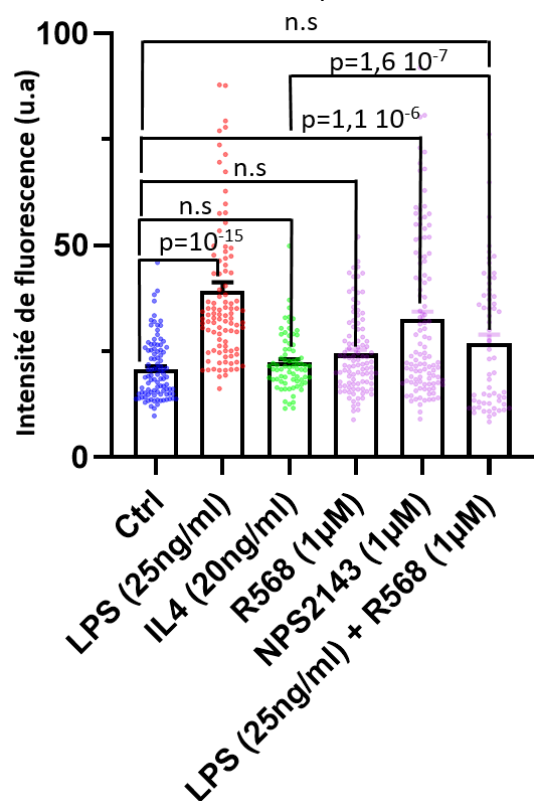
### VI.5.1 CaSR et polarisation pro inflammatoire – marquage CD68

Nous avons réalisé le marquage de la protéine CD68, surexprimée en condition pro inflammatoire, dans différentes conditions. Les résultats sont illustrés dans la figure 61.

Après quantification (Figure 62), on observe que le LPS (25 ng/ml) (n=101) induit une augmentation de l'expression de CD68 ( $39,3 \pm 2,01$  u.a.) ( $p=10^{-15}$ , *Dunn's post hoc* lorsque comparé au contrôle) et que l'IL-4 (20 ng/ml) (n=74) ne change pas le niveau d'expression de CD68 ( $22,36 \pm 0,76$  u.a.) par rapport à la condition contrôle ( $20,77 \pm 0,71$  u.a.) (n=98) ( $p=0,999$ , *Dunn's post hoc* lorsque comparé au contrôle) (Figure 62).

Le R568 (1 $\mu$ M, 24h) (n=101) ne change pas l'expression de CD68 par rapport au contrôle ( $24,44 \pm 0,92$  u.a.) ( $p=0,177$ , *Dunn's post hoc*), en revanche le NPS2143 (n=111) (1 $\mu$ M, 24h), augmente l'expression de CD68 par rapport au contrôle ( $32,60 \pm 1,78$  u.a.) ( $p=1,1 \cdot 10^{-6}$ , *Dunn's post hoc*) (Figure 62).

La co-incubation entre le LPS (25ng/ml) et le R568 (1 $\mu$ M) ( $26,95 \pm 2,03$ ) (n=61) diminue l'expression de CD68 par rapport à la condition LPS (25 ng/ml) seul ( $p=1,6 \cdot 10^{-7}$ , *Dunn's post hoc*) et revient au niveau d'expression de la condition « contrôle » ( $p=0,67$ , *Dunn's post hoc*).



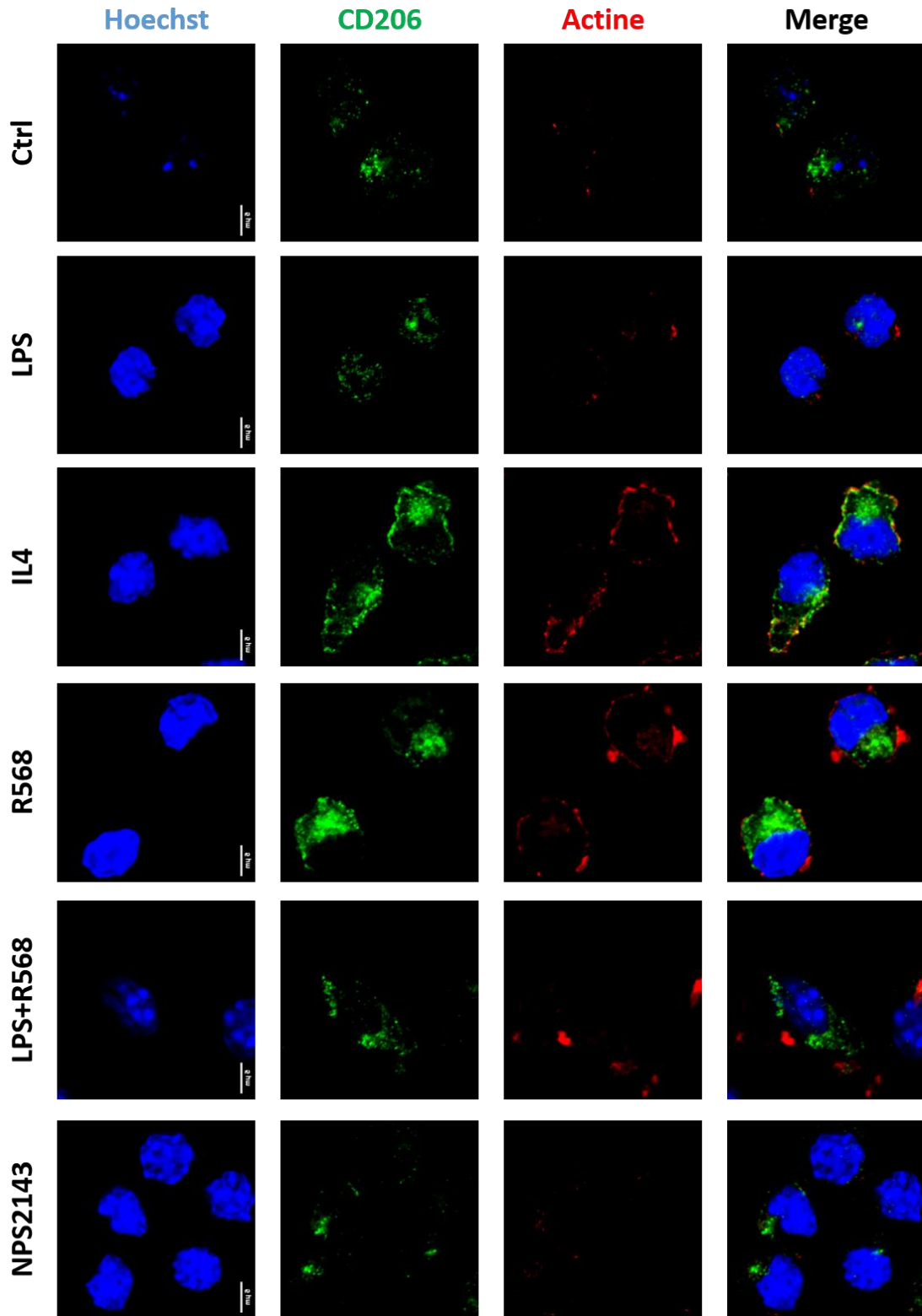
*Figure 62 : Histogramme représentant l'intensité de fluorescence pour le marquage CD68 (u.a.) de cellules BV-2 « contrôles » ou traitées (LPS, IL-4, R568, NPS2143, LPS + R568) pendant 24h. (p valeurs exactes, Test post hoc de Dunn).*

En résumé, l'activation du CaSR n'augmente pas l'expression de CD68 et réduit l'expression de CD68 induite par le LPS. L'inhibition du CaSR avec le NPS 2143 (1 $\mu$ M) augmente l'expression de CD68, signe d'une activation microgliale (pro-inflammatoire) (Figure 61 et 62).

#### VI.5.2 CaSR et polarisation anti inflammatoire –marquage CD206

Comme pour le marquage de CD68, nous avons marqué le noyau, l'actine et notre protéine d'intérêt, le CD206) en fonction de nos différentes conditions. L'expression de CD206 est faible à l'état basal et est exprimé en condition anti inflammatoire (phénotype induit avec une incubation IL-4 20 ng/ml pendant 24h) (Figure 63). Pour CD206 on observe très peu de marquages dans la condition « contrôle » (n=93), LPS (25 ng/ml) (n=112) et celle où les cellules sont traitées avec du NPS 2143 (1  $\mu$ M, 24h) (n=124). Pour les conditions IL-4 (n=77) et R568 (n=108) l'expression augmente et lors d'une co-incubation (n=64) LPS (25 ng/ml) et R568 (1 $\mu$ M) pendant 24h on a une augmentation de l'expression CD206 (Figure 63).



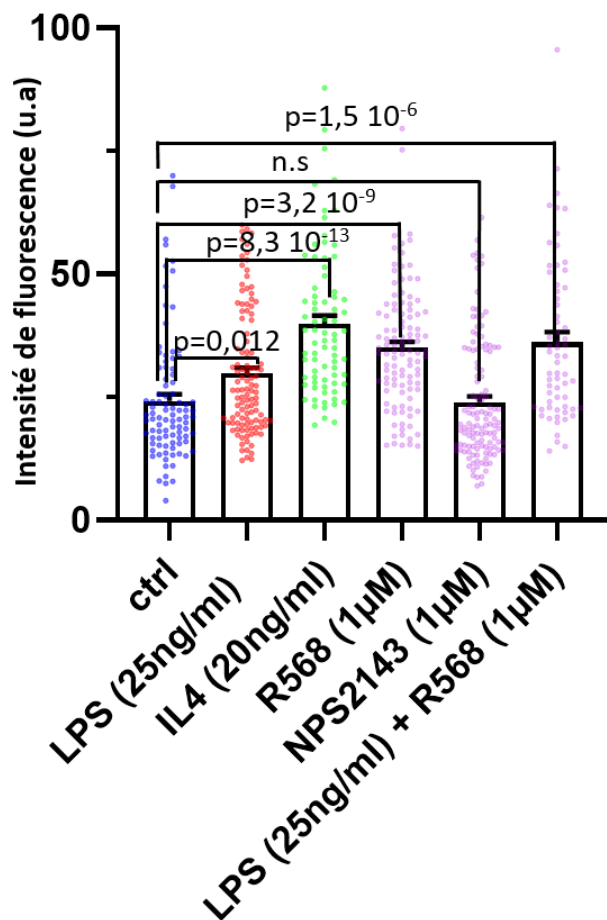


*Figure 63*: Image de microscopie confocale de cellules BV-2. Le noyau est marqué avec La sonde Hoechst (bleu), l'actine grâce à la phalloïdine atto 647-N (rouge), et le CD206 en vert pour nos six conditions (Contrôle, LPS, IL-4, R568, NPS2143, LPS + R568). Barre d'échelle : 5µm

La quantification de l'intensité de fluorescence totale (dans l'ensemble de la cellule), illustrée dans la figure 64, montre que l'expression de CD206 est augmentée dans la condition LPS (25 ng/ml) ( $29,79 \pm 1,19$  u.a.) par rapport à la condition « contrôle » ( $24,23 \pm 1,33$  u.a.) ( $p= 0,0119$ , *Dunn's post hoc*). L'IL-4 (20 ng/ml) et le R568 (1  $\mu$ M) induisent une augmentation de l'expression de CD206 (IL-4 :  $39,84 \pm 1,68$  u.a. et R568 :  $35,03 \pm 1,18$  u.a.) Ces valeurs sont significativement différentes de la valeur en condition «contrôle» ( $p=8,3 \cdot 10^{-13}$  et  $p=3,2 \cdot 10^{-9}$ , respectivement, *Dunn's post hoc*).

Le NPS 2143 (1 $\mu$ M) seul n'a pas d'effet sur l'expression de CD206 ( $23,99 \pm 1,11$  u.a.) qui reste à un niveau comparable celui observé en condition « contrôle » ( $p=0,99$ , *Dunn's post hoc*).

Lorsque les cellules microgliales BV-2 sont incubées avec du LPS (25 ng/ml) et du R568 (1 $\mu$ M) pendant 24h on augmente l'expression de CD206 ( $36,14 \pm 2,03$  u.a.) par rapport au « contrôle » ( $p=1,5 \cdot 10^{-6}$ , *Dunn's post hoc*) et le niveau d'expression est identique à la condition IL-4 (20ng/ml, 24h) ( $p=0,99$ , *Dunn's post hoc*).



*Figure 64: Représentation graphique de l'intensité de fluorescence pour le marquage CD206 (u.a.) de cellules BV-2 « contrôles » ou traitées (LPS, IL-4, R568, NPS2143, LPS + R568) pendant 24h. (p valeurs exactes, Test post hoc de Dunn).*

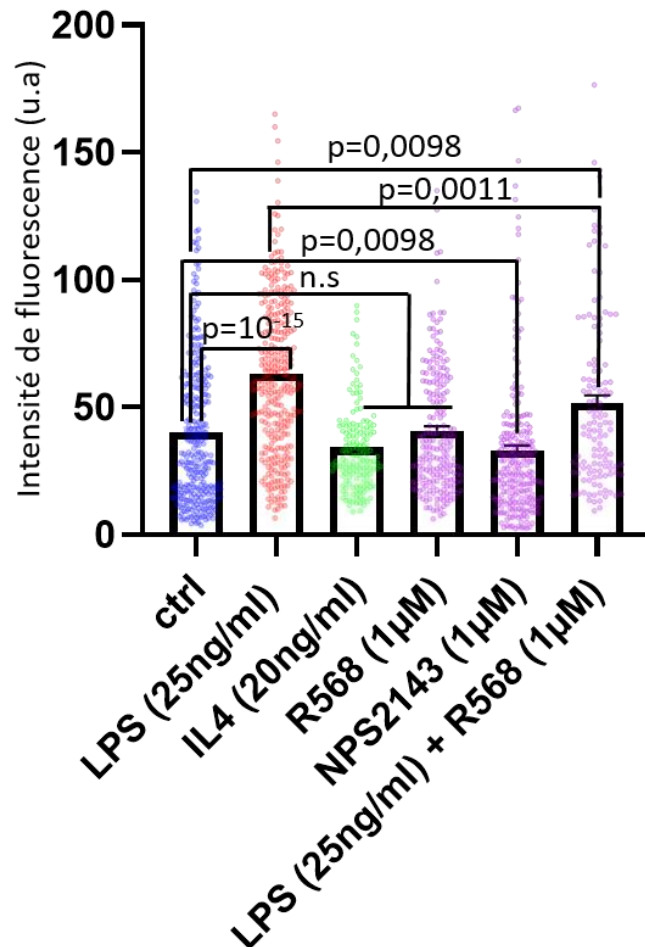
En résumé, l'activation du CaSR avec du R568 (1 $\mu$ M, 24h) augmente l'expression du marqueur anti-inflammatoire CD206, à des valeurs comparables à celles observées lors d'un traitement à l'IL-4 (20 ng/ml), connu pour induire un phénotype anti-inflammatoire. Dans nos conditions, une faible dose de LPS (25 ng/ml, 24h) augmente également l'expression de CD206 par rapport au « contrôle », un phénomène qui est peut être dû à la faible concentration de LPS utilisé pouvant initier, l'activation microgliale (phénomène de priming de l'immunité innée) (voir chapitre « introduction »). Même si on observe une augmentation de l'expression de CD206 pour le LPS seul, la co-administration de R568 avec le LPS renforce l'expression du CD206. Une inhibition du CaSR avec du NPS 2143 (1 $\mu$ M, 24h) diminue l'expression de CD206 (Figure 63 et 64).

### VI.5.3 CaSR et actine corticale

L'actine est une protéine intracellulaire chargée de réguler l'architecture et la structure de la cellule ainsi que les processus de migration et de division cellulaire. Sa polymérisation est calcium-dépendante. Comme nous l'avons vu plus haut, lors du processus d'activation, la morphologie des cellules microgliales change, elle passe d'une morphologie allongée à une morphologie ronde. Ce processus nécessite une réorganisation rapide du cytosquelette d'actine. L'état de polymérisation de l'actine est contrôlé par la concentration de calcium libre intracellulaire ou par des protéines qui interagissent avec de l'actine, telle que par exemple avec de la myosine.

La figure 65 quantifie l'actine membranaire et sous membranaire (subplasmalemmale) en fonction des différentes conditions de traitement. Lorsque les cellules BV-2 sont stimulées avec du LPS (25 ng/ml, 24h) (n=310) le marquage de l'actine corticale est plus intense ( $63,08 \pm 1,74$  u.a.) qu'en condition «contrôle» (n=303) ( $40,46 \pm 1,65$  u.a.) ( $p=10^{-15}$ , *Dunn's post hoc*). Par contre, lorsque les cellules sont traitées avec du R568 (1 $\mu$ M, 24h) (n=209) ou avec de l'IL-4 (20 ng/ml, 24h) (n=151) les intensités de marquage de l'actine corticale sont comparables à celle observée en condition «contrôle» : R568 :  $40,85 \pm 1,68$  ; IL-4  $34,19 \pm 1,36$  u.a ( $p>0,999$  pour IL-4 et R568 par rapport au « contrôle », *Dunn's post hoc*). Un traitement avec du NPS 2143 (1 $\mu$ M, 24h) (n=235) seul se traduit par une diminution de l'intensité de marquage de l'actine corticale ( $33,16 \pm 1,87$  u.a.) par rapport à la condition «contrôle» ( $p=0,0092$ , *Dunn's post hoc*).

Lorsque les cellules BV-2 sont traitées simultanément avec du LPS (25ng/ml, 24h) et du R568 (1 $\mu$ M, 24h) (n=125) on observe une diminution de l'intensité de marquage de l'actine (51,68  $\pm$  3,08 u.a.) par rapport à la condition LPS (25ng/ml, 24h) seul (p=0,0011, *Dunn's post hoc*), mais cette valeur reste supérieure à celle observée en condition «contrôle» (p= 0,0098, *Dunn's post hoc*).



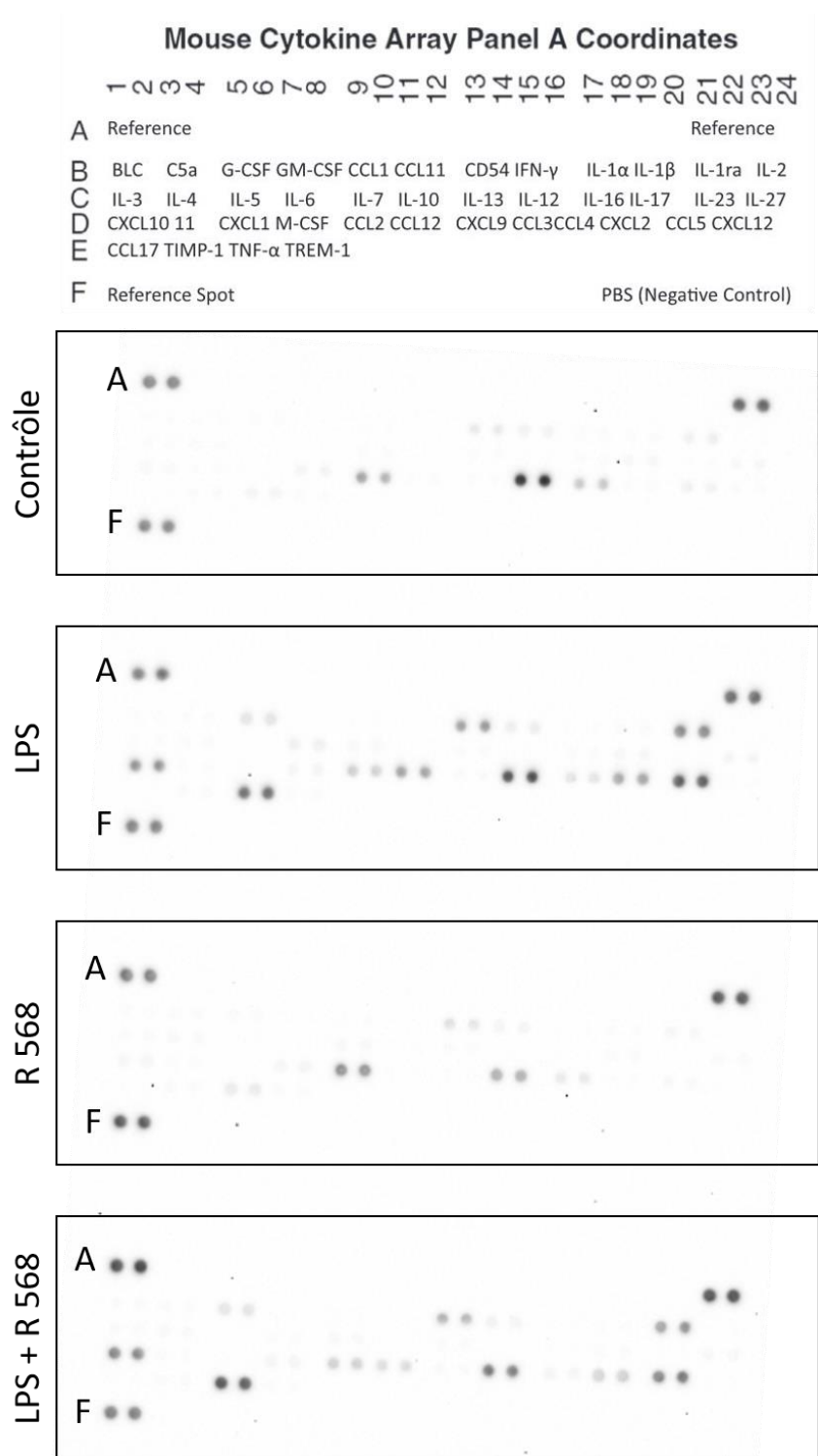
*Figure 65:* Graphique représentant l'intensité de fluorescence pour le marquage de l'actine corticale (u.a) de cellules BV-2 contrôles ou traitées (LPS, IL-4, R568, NPS2143, LPS + R568) pendant 24h. (p valeurs exactes, Test post hoc de Dunn).

En résumé, l'activation des cellules microgliales BV-2 induit un changement dans le cytosquelette d'actine. L'inhibition du CaSR semble interférer avec les dynamiques de polymérisation et dépolymérisation de l'actine.

#### VI.5.4 Activation du CaSR et sécrétion de cytokines

Les niveaux de cytokines et chemokines présentes dans le surnageant de nos cultures ont été mesurés en utilisant le *Proteome Profiler Antibody Array – Mouse Cytokine Array Panel A*. Nous avons dosé les molécules solubles dans quatre conditions expérimentales : contrôle (changement de milieu), LPS (25ng/ml, 24h), R 568 (1 $\mu$ M, 24h) et LPS + R 568 (24h). Les images obtenues après 4 minutes d'exposition sont présentées dans la figure 66.

Nos résultats sont préliminaires car un cytokine array a été fait jusqu'à maintenant. Pour l'instant l'analyse effectuée est qualitative (absence, présence, augmentation ou diminution). Une analyse plus approfondie sera effectuée suite à une deuxième série d'expériences destinée à vérifier la reproductibilité des résultats.



*Figure 66:* Image des membranes de cytokines array (4 min exposition) après avoir exposé les cellules BV-2 pendant 24h au LPS (25ng/ml) ou à l'IL-4 (20ng/ml) ou au R568 (1 $\mu$ M) ou au LPS + R568. Plus le point est intense plus cette molécule est retrouvée dans le surnageant.

#### VI.5.4.1 Cytokines pro-inflammatoires

Concernant les cytokines pro-inflammatoires (Tableau 16), nous n'avons pas détecté la présence d'IL-1 $\beta$  et ce, indépendamment de nos conditions. Pour le TNF- $\alpha$ , un traitement avec du LPS (25ng/ml, 24h) augmente son expression par rapport au « contrôle ». De même, un traitement avec du LPS (25ng/ml) et du R 568 (1 $\mu$ M, 24h) augmente la concentration de TNF $\alpha$  dans le surnageant comparé au « contrôle ». Lorsque on compare la condition LPS (25ng/ml, 24h) à la condition LPS + R568 on remarque un niveau de TNF $\alpha$  plus élevé lorsque les cellules sont stimulées avec du LPS + du R 568. L'IL-6 est également augmentée en condition LPS (25ng/ml, 24h) par rapport au « contrôle ». En revanche, lorsque du R568 est présent en plus du LPS on observe une diminution par rapport au LPS seul, et on retourne à un niveau similaire à la condition « contrôle ». Concernant CCL3 et CCL4, le LPS ne change pas le niveau dans le surnageant pour CCL3 mais diminue celui du CCL4 par rapport au « contrôle ». La co-incubation LPS + R568 diminue les concentrations pour CCL3, CCL4 par rapport à la condition « contrôle ».

**En résumé le R568 diminue les concentrations de CCL3, CCL4 et IL-6 lorsqu'il est co-incubé avec du LPS par rapport au LPS seul (tableau 16).**

	Cytokines pro-inflammatoires				
	CCL3	CCL4	IL-1 $\beta$	IL-6	TNF $\alpha$
LPS (vs Ctrl)	=	↓	X	↑	↑
LPS + R568 (vs Ctrl)	↓	↓	X	=	↑
LPS + R568 (vs LPS)	↓	↓	X	↓	↑

*Tableau 16 : Tableau récapitulatif des cytokines pro-inflammatoires dosées par le cytokine array (analyse qualitative)*

#### VI.5.4.2 Molécules chémoattractantes

Pour les molécules chémoattractantes (Tableau 17), une incubation pendant 24h avec du LPS (25 ng/ml) diminue la concentration de CCL2/MCP1 dans le surnageant et augmente la concentration de CCL12/MCP5, CXCL2, CXCL10 et CCL5/Rantes par rapport à la condition « contrôle ». Lorsque le LPS est co-incubé avec du R568 (1µM, 24h) on observe le même profil que pour le LPS par rapport à la condition « contrôle » (diminution de CCL2/MCP1 et augmentation de CCL12/MCP5, CXCL2, CXCL10 et CCL5/Rantes) (Tableau 17). Lorsqu'on compare le LPS seul à la condition LPS + R 568 on observe que l'ajout du R568 ne change pas la quantité de CCL2/MCP1 par rapport au LPS seul. En revanche, pour CCL12/MCP5, CXCL2 et CCL5/Rantes on note une baisse dans le surnageant et pour le CXCL10 on observe une augmentation, lorsque comparées au LPS seul (Tableau 17).

**En résumé l'ajout de R568 augmente la concentration de CXCL10 et diminue celle de CCL12/MCP5, CXCL2 et CCL5/Rantes par rapport au LPS seul. Il n'y a pas de différence CCL12/MCP1 (LPS+R568 vs LPS) (Tableau 17).**

	Chemoattractantes				
	CCL2/MCP1	CCL12/MCP5	CXCL2	CXCL10	CCL5/RANTES
LPS (vs Ctrl)	↓	↑	↑	↑	↑
LPS + R568 (vs Ctrl)	↓	↑	↑	↑	↑
LPS + R568 (vs LPS)	=	↓	↓	↑	↓

*Tableau 17 : Tableau récapitulatif des molécules chemoattractantes dosées par le cytokine array (analyse qualitative)*



#### VI.5.4.3 Facteurs de croissance

Les concentrations des facteurs de croissance G-CSF et M-CSF/CSF61 dans le surnageant sont tous les deux augmentées lorsque les cellules BV-2 sont traitées avec du LPS (25ng/ml, 24h) seul ou en présence de R568 (1 $\mu$ M, 24h) par rapport à la condition « contrôle ». Aucune différence n'est visible entre le LPS seul et le LPS + R568 (Tableau 18).

#### VI.5.4.4 Molécules d'adhésion

La concentration de la molécule d'adhésion CD54/ICAM-1 est augmentée dans le surnageant lorsque les cellules BV-2 sont incubées avec du LPS (25ng/ml, 24h) seul ou en présence de R568 (1 $\mu$ M) par rapport à la condition « contrôle ». Si on compare le LPS seul ou en présence de R568, on observe une **diminution de CD54/ICAM-1 en présence de R568 (1 $\mu$ M)** (Tableau 18).

#### VI.5.4.5 Molécule anti-inflammatoire IL-1ra

La quantité de l'antagoniste du récepteur à l'IL-1 (IL-1ra) dans le surnageant est augmentée en condition LPS (25ng/ml, 24h) seul et lorsqu'il est en présence de R568 (1 $\mu$ M, 24h) par rapport à la condition « contrôle ». L'ajout du R568 (1 $\mu$ M) **diminue la concentration dans le surnageant par rapport à la condition LPS (25ng/ml, 24h) seul** (Tableau 18).

	Facteurs de croissance		Adhésion	Anti-inflammatoire
	G-CSF	M-CSF/CSF61	CD54/ICAM-1	IL-1 $\alpha$
LPS (vs Ctrl)	↑	↑	↑	↑
LPS + R568 (vs Ctrl)	↑	↑	↑	↑
LPS + R568 (vs LPS)	=	=	↓	↓

*Tableau 18: Tableau récapitulatif des facteurs de croissance, molécule d'adhésion et anti inflammatoire dosées par le cytokine array (analyse qualitative).*

#### VI.5.4.6 Molécules impliquées dans le développement, la survie et l'homéostasie

Finalement, concernant les molécules solubles qui peuvent être impliquées dans le développement, la survie cellulaire et l'homéostasie (IL-7, CCL3 et CCL4), on observe une diminution pour l'IL-7 et la CCL4 par rapport au « contrôle », lorsque les cellules sont traitées avec du LPS (25ng/ml, 24h), en présence ou non de R568 (1 $\mu$ M).

L'ajout du R568 (1 $\mu$ M), en plus du LPS (25 ng/ml), pendant 24h, diminue également la concentration de CCL3 par rapport à la condition contrôle.

Lorsqu'on compare le LPS seul ou en présence de R568, on ne remarque pas de différence pour l'IL-7, mais la CCL3 et CCL4 sont diminués lorsque le R568 est présent (Tableau 19).

#### VI.5.4.7 Interféron $\gamma$ (INF- $\gamma$ )

Pour l'interféron  $\gamma$  (INF- $\gamma$ ) on n'a pas de différence entre nos conditions (Tableau 19).

	Développement, survie et homéostasie			Activation macrophage
	IL-7	CCL3	CCL4	INF- $\gamma$
LPS (vs Ctrl)	↓	=	↓	=
LPS + R568 (vs Ctrl)	↓	↓	↓	=
LPS + R568 (vs LPS)	=	↓	↓	=

*Tableau 19: Tableau récapitulatif des molécules impliquées dans le développement, la survie cellulaire, l'homéostasie et l'activation de macrophage dosées par le cytokine array (analyse qualitative)*

Au vu des résultats présentés, les cellules microgliales BV-2 expriment bien le CaSR. Un traitement au LPS (25 ng/ml) augmente son expression totale. Cependant les cellules BV-2 traitées au LPS répondent moins aux agonistes du CaSR ( $Gd^{3+}$ , R568) lors de nos expériences d'imagerie du calcium libre intracellulaire. Cela peut être expliqué par une expression subplasmalemmale diminuée après traitement au LPS.

Lorsqu'on ne regarde que les changements morphologiques, la modulation du CaSR exprimé par les cellules microgliales BV-2 semble induire un phénotype pro inflammatoire. La morphologie ronde des cellules ressemble à celle observée après activation de la microglie avec du LPS. En revanche, même si les cellules BV-2 après activation du CaSR sont rondes, elles expriment le CD206 (marqueur anti inflammatoire). De plus, un co-traitement LPS + R568 diminue l'expression de CD68 par rapport au LPS seul et augmente l'expression de CD206.

## VII. Discussion

### VII.1 Cellules microgliales et récepteurs P2X

Les cellules microgliales jouent un rôle important dans le maintien de l'homéostasie du système nerveux central. Ces cellules sondent en permanence le milieu environnant pour détecter des changements de composition du milieu extracellulaire (composition ionique, pH) ainsi que la présence de messagers extracellulaires libérés par les neurones ou les cellules gliales (astrocytes, oligodendrocytes et cellules microgliales). L'ATP peut être libérée par l'ensemble des cellules du système nerveux central et représente l'une des principales molécules de signalisation dans le SNC. Par conséquent, les cellules gliales doivent être capables de détecter des concentrations d'ATP dans une large gamme de concentration, nanomolaire, micromolaire et millimolaire. Une telle détection ne peut pas se faire à l'aide d'un seul type de récepteur de l'ATP car l'encodage de message doit se faire sur une gamme de concentration d'au moins 6 unités logarithmiques. Il faut donc envisager l'existence de plusieurs types de récepteurs de l'ATP avec des gammes de sensibilités différentes et complémentaires pouvant couvrir cette large gamme de concentrations.

Il est classiquement admis que les cellules microgliales, y compris les cellules BV-2, expriment des récepteurs P2X4 et P2X7 fonctionnels. Selon les espèces, les  $EC_{50}$  pour l'ATP varient (Donnelly-Roberts, 2009). Ainsi, le récepteur P2X4 possède un  $EC_{50}$  dans la gamme micromolaire basse (1-10  $\mu$ M) et le récepteur P2X7 dans la gamme micromolaire haute voire millimolaire (100-200  $\mu$ M) (Illes et al., 2021). Ces deux types de récepteurs peuvent donc détecter des concentrations d'ATP allant environ de 0.1  $\mu$ M à 1 mM. Néanmoins, l'ATP libérée est très rapidement dégradée dans le milieu extracellulaire par les ectonucléotidases extracellulaires qui la métabolisent en ADP, AMP et adénosine (Zimmerman, 2000) (Fields et Burnstock, 2006). Il a ainsi été estimé que dans l'hippocampe la dégradation complète de l'ATP en adénosine prend environ 200 ms (Dunwiddie, Diao et Proctor, 1997). On peut donc s'attendre à ce que, dans des conditions physiologiques, les concentrations d'ATP extracellulaires soient très basses et que les concentrations micromolaires

ne soient atteintes qu'en cas de libération massive et synchrone d'ATP. Des concentrations millimolaires sont très peu probables dans des conditions physiologiques, mais pourraient être atteintes dans des situations pathologiques dans le cas de destructions ou de lésions cellulaires permettant la fuite non régulée vers le milieu extracellulaire de l'ATP présente à des concentrations millimolaires dans le cytoplasme.

Une question importante est donc de savoir comment se fait la détection fine de faibles concentrations extracellulaires d'ATP qui sont impliquées dans la communication intercellulaire dans les conditions physiologiques.

Cette détection nécessite la présence de récepteurs à haute affinité pour l'ATP et/ou l'ADP. D'une manière générale les récepteurs couplés aux protéines G ont des affinités plus grandes pour l'agoniste endogène que les récepteurs-canaux et ceci se vérifie également pour les récepteurs P2Y (Xing et al., 2016). Les cellules microgliales et BV-2 expriment des récepteurs P2X et P2Y (Abbracchio et al., 2009) (Fields et Burnstock 2006) (Light et al., 2006) (Gendron et al., 2003). Il est donc communément admis que les récepteurs P2Y sont responsables de la détection des faibles concentrations d'ATP alors que les récepteurs-canaux de type P2X détectent les fortes concentrations d'ATP extracellulaire. Cependant, certains récepteurs P2X tels que P2X1, P2X1/5 et P2X3 présentent une forte affinité pour l'ATP.

#### VII.1.1 Récepteurs P2X à haute affinité pour l'ATP : P2X1, P2X3 et P2X1/5.

Chez la souris, les  $EC_{50}$  de l'ATP des récepteurs P2X1 et P2X1/5 sont de 0.36  $\mu$ M (Sim, Broomhead et North, 2008) et de 0.4  $\mu$ M (Lalo et al., 2008) respectivement. De plus, il est important de noter que ces valeurs d' $EC_{50}$  ont été déterminées dans des cellules natives et non pas dans un système d'expression, et représentent donc des valeurs proches de celles rencontrées *in vivo*. Ces récepteurs pourraient donc participer à, voire être responsables de, la détection des faibles concentrations d'ATP dans la gamme nanomolaire.

La présence d'ARN messagers codants pour les sous-unités P2X1 et P2X5 a été documentée dans les cellules BV-2 (Brautigam et al., 2005) ainsi que dans les cellules microgliales de la lignée murine N9 (Bianco et al., 2005). Une expression de P2X1 a également été décrite dans les cellules microgliales primaires de rat (Xiang et Burnstock, 2005). Cependant, aucune des études n'a pu montrer la fonctionnalité de ces récepteurs, même dans le cas où l'expression d'ARNm a été documentée dans la même étude (Light et al., 2006). L'absence de description de récepteurs autres que P2X4 et P2X7 dans les études sur les cellules microgliales et les cellules BV-2 pourrait être liée aux conditions de culture et/ou expérimentales (type d'agoniste utilisée, vitesse d'application de l'antagoniste, température (ambiante versus 34-37 °C), ...) (Trang et al., 2020) (Raouf et al., 2007).

**Récepteurs P2X1** : Nos résultats montrent que dans nos conditions de culture standardisées, les cellules BV-2 répondent à de faibles concentrations d' $\alpha\beta$ meATP (1  $\mu$ M) qui activent préférentiellement les récepteurs P2X1 et P2X3 (voir tableau 15 des EC<sub>50</sub>) par des augmentations de la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>. Ce type de réponse a été observé dans environ 20% des cellules (Figure 35 C1) et ne présente pas d'augmentation dose dépendante entre 1 et 10  $\mu$ M (Figure 35 C1) suggérant que la réponse est déjà maximale à une concentration d' $\alpha\beta$ meATP de 1  $\mu$ M. Cette réponse semble donc impliquer des récepteurs à haute affinité pour l' $\alpha\beta$ meATP. Les réponses à l' $\alpha\beta$ meATP 1  $\mu$ M présentaient par ailleurs une forte désensibilisation et étaient bloquées par le NF449 à une concentration de 20 nM, une concentration à laquelle cet antagoniste est très spécifique pour les récepteurs P2X1 par rapport aux autres récepteurs P2X (Rettinger et al., 2005)(Hechler et al., 2005) y compris chez la souris (Sim, Broomhead et North, 2008).

**Ces données suggèrent la présence de récepteurs P2X1 homomériques fonctionnels dans les cellules BV-2.**

**Récepteurs P2X1/5** : Etant donné que l'EC<sub>50</sub> de l' $\alpha\beta$ meATP pour les récepteurs P2X1/5 de souris est de 0.16  $\mu$ M, une application d' $\alpha\beta$ meATP (1  $\mu$ M) va activer à la fois les récepteurs homomériques P2X1 et hétéromériques P2X1/5 mais pas les récepteurs P2X3 (Jones et al., 2000).

Le NF449 inhibe également les récepteurs hétéromériques P2X1/5 avec un  $IC_{50}$  comparable à celui des récepteurs P2X1. Dans les astrocytes de souris *in situ* l' $IC_{50}$  du NF449 sur les récepteurs P2X1/5 de souris a été estimé à 20-30 nM. Par conséquent, une inhibition ou un blocage de la réponse  $\alpha\beta$ meATP (1  $\mu$ M) par une faible concentration de NF449 confirme l'implication de récepteurs incluant la sous-unité P2X1 (mais pas P2X3) dans la réponse observée. Le fait que le TNP-ATP à 50 nM, une concentration à laquelle il est spécifique de P2X3 (Zhong et al., 2001) (Ma et al., 2004), n'a pas significativement affecté la réponse à 1  $\mu$ M d' $\alpha\beta$ meATP dans nos expériences, confirme cette hypothèse.

Pour ce qui est de la composante P2X1 de la réponse, on pourrait s'attendre à l'implication de récepteurs homomériques ou hétéromériques. Les récepteurs P2X1 homomériques présentent une très forte désensibilisation. Nous avons effectivement observé que les réponses à l' $\alpha\beta$ meATP présentent une désensibilisation prononcée (voir Figure 36 A1 et 36 B1). De manière intéressante, dans 50% des cas/cellules la deuxième application d' $\alpha\beta$ meATP 1  $\mu$ M 200 s après la première n'a pas induit de réponse, ce qui indique une très forte désensibilisation de la réponse qui pourrait donc impliquer des récepteurs P2X1 homomériques. Dans les autres 50%, nous avons observé une diminution de la réponse à l' $\alpha\beta$ meATP mais pas de blocage complet plus modérée, ce qui pourrait refléter l'implication des récepteurs hétéromériques P2X1/5 (Torres et al., 1998) (Haines et al., 1999).

Les récepteurs P2X1/5 sont inhibés par le TNP-ATP à des concentrations micromolaires, mais de manière intéressante, le TNP-ATP peut également activer ces récepteurs, notamment à des concentrations nanomolaires (Surprenant et al., 2000). Dans nos expériences, l'application de TNP-ATP seule à des concentrations comprises entre 50 nM et 30  $\mu$ M a induit une élévation de la  $[Ca^{2+}]_i$ . A toutes ces concentrations testées, la réponse propre au TNP-ATP a toujours eu un décours transitoire même durant des applications longues (100 s) et à faible concentration. Ceci suggère que le TNP-ATP pourrait activer les récepteurs P2X1/5 à faible concentration avant de les bloquer. Ce point nécessitera des expériences de biophysique spécifiques pour être éclairci. Quoiqu'il en soit, le TNP-ATP appliqué seul s'est révélé être un outil intéressant et précieux pour mettre en évidence la présence de récepteurs P2X1/5 fonctionnels dans nos expériences. De plus,

la réponse propre au TNP-ATP était réversiblement bloquée par la suramine 10  $\mu\text{M}$ . Ce phénomène ne peut être expliqué que si des récepteurs P2X1/5 sont impliqués dans la réponse. En effet, les récepteurs P2X1 homomériques de souris sont insensibles à une concentration de suramine de 10  $\mu\text{M}$  (Ikeda, 2007). La sensibilité des récepteurs P2X5 de souris n'est pas connue, mais l' $\text{IC}_{50}$  de la suramine pour les récepteurs P2X5 humains est de 3  $\mu\text{M}$  (Bo et al., 2003). L'effet de la suramine sur les réponses propres du TNP-ATP est compatible avec **l'implication de récepteurs P2X1/5** sensibles à la suramine. Il est également intéressant de noter que la fraction de cellules qui répondent à l' $\alpha\beta\text{meATP}$  1  $\mu\text{M}$  (**environ 20%**) est comparable à celle qui présente une réponse propre au TNP-ATP (entre 20 et 30 %).

Nous avons également pu mettre en évidence la présence de récepteurs homomériques qui coexistent avec les récepteurs P2X5. Ces récepteurs sont activés par le GTP et inhibés lorsque l'on augmente la concentration extracellulaire de  $\text{Ca}^{2+}$ .

**L'ensemble de ces données suggèrent la présence de récepteurs P2X1, P2X5 homomériques et P2X1/5 hétéromériques fonctionnels dans les cellules BV-2.**

**Récepteurs P2X3** : Comme nous l'avons déjà discuté plus haut la réponse à l' $\alpha\beta\text{meATP}$  1  $\mu\text{M}$  n'a pas été affectée significativement par une concentration de TNP-ATP 50 nM qui devrait en principe efficacement et sélectivement inhiber les récepteurs P2X3 sans trop affecter les récepteurs P2X1 (voir Figure 34  $\text{pIC}_{50}$  des antagonistes). En effet, l' $\text{IC}_{50}$  du TNP-ATP pour le récepteur P2X3 est de 1,4 nM (Ma et al., 2004) et de 4  $\mu\text{M}$  pour P2X1 (Abdelrahman et al., 2017). On ne peut cependant pas exclure que la concentration d' $\alpha\beta\text{meATP}$  utilisée ait été trop faible pour activer les récepteurs P2X3 ( $\text{EC}_{50}=5,6$   $\mu\text{M}$  chez la souris). Nous avons donc décidé d'activer les récepteurs P2Xs par l'ATP (10  $\mu\text{M}$ ) et de tester sur cette réponse composite (car l'ATP à 10  $\mu\text{M}$  active tous les récepteurs P2Xs sauf P2X7) l'effet du TC-P262, un antagoniste très sélectif de P2X3 (Ballini et al., 2011). Le TC-P262 (10  $\mu\text{M}$ ) a significativement, mais faiblement, inhibé la réponse à l'ATP. Par contre, le NF449 (antagoniste P2X1 et P2X1/5) a bloqué la réponse réversiblement. Ces données suggèrent que la réponse à l'ATP est dominée par les récepteurs P2X1 et/ou P2X1/5.



L'effet inhibiteur du TC-P262 indique qu'il y a une contribution relativement faible de récepteurs homomériques P2X3 ou hétéromériques contenant la sous-unité P2X3. L'effet du NF449 permet de spéculer qu'il pourrait s'agir de récepteurs P2X1/3. Les données de la littérature ont montré que les récepteurs P2X1/3 et P2X3/5 pouvaient se former dans des systèmes d'expression hétérologues (cellules HEK 293 transfectées) (Torres, Egan et Voigt, 1999), mais ces hétéromères n'ont jamais été mis en évidence dans des cellules natives exprimant P2X1, P2X3 et P2X5.

Les récepteurs P2X2/3 qui sont les hétéromères les plus fréquemment rencontrés pour P2X3, ne contribuent pas à la réponse à l'ATP dans les cellules BV-2 car : (1) il n'y a pas de trace d'ARNm de P2X2 dans les cellules BV-2 (Brautigam et al., 2005), (2) les réponses de l'ATP ne sont pas potentialisées par la déhydroépiandrostérone (DHEA 10  $\mu$ M) ou la Progestérone (10  $\mu$ M) qui facilitent les réponses P2X2/3 et P2X2 respectivement (De Roo, Boué-Grabot et Schlichter, 2010) (données non présentées). L'hypothèse la plus probable est donc que la composante de la réponse à l'ATP sensible à l'inhibition soit due à des hétéromères P2X1/3 ou P2X3/5. Malheureusement il n'existe pas à l'heure actuelle d'outils pharmacologiques permettant de répondre à cette question.

#### VII.1.2 Récepteurs P2X à affinités intermédiaires et faibles pour l'ATP

**Récepteurs P2X4 et P2X7** : la présence de récepteurs P2X4 et P2X7 a été largement documentée dans les cellules BV-2 (Brautigam et al., 2005) (Grendon et al., 2003) (Raouf et al., 2007) (Bernier et al., 2012) et les cellules microgliales primaires (Light et al., 2006). Nos données confirment la présence de récepteurs P2X4 fonctionnels dans environ 80% des cellules BV-2 de nos cultures et la présence de récepteurs P2X7 fonctionnels dans 96% des cellules. Les réponses P2X4 sont inhibées par un antagoniste spécifique, le 5-BDBD (10  $\mu$ M), et les réponses P2X7 par deux antagonistes sélectifs le A740003 (10  $\mu$ M) et l'AZ10606120 (1  $\mu$ M).

### VII.1.3 Interactions fonctionnelles des récepteurs P2X

Au cours de nos expériences nous avons également observé des interactions fonctionnelles entre les différents récepteurs P2X exprimés par les cellules BV-2. Ces interactions se sont révélées dans les expériences où nous avons testé des applications cumulées de différents antagonistes pour évaluer leurs effets sur les réponses à un agoniste. Les principales informations dérivées de ces expériences sont résumées dans les tableaux ci-dessous.

En fonction des différents antagonistes appliqués, nous avons pu élaborer quatre situations permettant de supposer des interactions fonctionnelles entre les récepteurs fonctionnels décrits lors de nos expériences sur les cellules microgliales BV-2. Ces quatre situations sont résumées ci-dessous (Tableau 20, 21, 22 et 23).

Agoniste	Récepteurs P2X activés	Antagoniste 1	Récepteurs P2X bloqués	Récepteurs P2X non affectés par antagoniste 1	Antagoniste 2	Récepteurs P2X bloqués	Récepteurs P2X non affectés par antago 1 + antago 2	Effet de l'antagoniste 2	Interprétation
abme ATP (100 µM)	P2X4, P2X5, P2X1/5 P2X1 et P2X3 désensibilisés	5-BDBD (10 µM)	P2X4 (80%)	P2X4 (20%), P2X1, P2X5, P2X1/5	TNP-ATP (10 µM)	P2X1/5 P2X1 et P2X3 désensibilisés	P2X4 (20%), P2X5	Potentialisation	P2X1/5 inhibe P2X4, ou/et P2X1/5 inhibe P2X5

**Tableau 20:** Effet du TNP-ATP (antagoniste P2X1, P2X3, P2X1/5) en présence de 5-BDBD (antagoniste P2X4)

**Situation 1 :** En présence de 5-BDBD (10 µM) les récepteurs P2X4 sont inhibés à 80%. En effet l'EC<sub>50</sub> du 5-BDBD pour les récepteurs P2X4 de souris est de 2 µM (Abdelrahman et al., 2017) et nous n'avons pas utilisé de concentration supérieure à 10 µM car à ces concentrations le 5-BDBD inhibe également les récepteurs P2X1 et P2X3 (Coddou et al., 2019). Néanmoins à 10 µM on observe une forte réduction des réponses P2X permettant de conclure à la présence de récepteurs P2X4, même si cette inhibition n'est estimée qu'à environ 80%.

Lorsque l'agoniste utilisé est l'αβmeATP à forte concentration (100 µM), on active les récepteurs P2X1, P2X3, P2X4 et P2X1/5. A cette forte concentration, les récepteurs P2X1 et P2X3 sont très certainement dans un état désensibilisé dès la première application de l'agoniste. En présence de 5-BDBD (10 µM), l'application de TNP-ATP (10 µM), qui bloque les récepteurs P2X1, P2X3, et P2X1/5, a induit une potentialisation de la réponse αβmeATP 100 µM. Cette réponse est probablement médiée aux récepteurs P2X4 (20%) qui ne sont pas bloqués par 10 µM de 5-BDBD.

On peut donc spéculer que l'inhibition de P2X1/5 facilite l'activité des récepteurs P2X4 et par conséquent que dans des conditions physiologiques **les récepteurs P2X1/5 inhibent les récepteurs P2X4**.

N.B. La modulation de récepteurs P2X5 est envisageable mais très peu probable vu la très faible affinité de l'abme ATP pour ce récepteur ( $EC_{50}$  161  $\mu$ M pour P2X5 humain) (Bo et al., 2003).

Condition	Agoniste	Récepteurs P2X activés	Antagoniste 1	Récepteurs P2X bloqués	Récepteurs P2X non affectés par antagoniste 1	Antagoniste 2	Récepteurs P2X bloqués	Récepteurs P2X non affectés par antago 1 + antago 2	Effet de l'antagoniste 2	Interprétation
Contrôle	BzATP (5 $\mu$ M)	P2X1, P2X3, P2X4, P2X5, P2X1/5	Suramine (10 $\mu$ M)	P2X3, P2X5, P2X1/5	P2X1, P2X4	5-BDBD	P2X4	P2X1	pas d'effet	P2X4 n'interagit pas avec P2X1
LPS (augmente l'expression P2X4 et P2X1/5)	BzATP (5 $\mu$ M)		Suramine potentialise réponse BzATP 5 $\mu$ M)				P2X4 (80%)	P2X4 (20%)	inhibition et/ou blocage réponse	P2X1/5 (ou P2X3 ou P2X5) inhibe P2X4

**Tableau 21 :** Effet du 5-BDBD (antagoniste P2X4) en présence de suramine (antagoniste P2X3, P2X5 et P2X1/5)

**Situation 2 :** Le BzATP à une concentration de 5  $\mu$ M active l'ensemble des récepteurs P2X, excepté P2X7. La suramine (10  $\mu$ M) bloque les récepteurs P2X3, P2X5 et P2X1/5 mais pas P2X1 chez la souris M (Sim, Broomhead et North, 2008). **En condition «contrôle», on en déduit que le blocage de P2X4 ne module pas l'activité de P2X1.**

Nous avons répété ces expériences sur des cultures traitées au LPS (24 ng/mL, 24h), une condition connue pour augmenter l'expression et l'activité des récepteurs P2X4 dans les cellules BV-2 (Raouf et al., 2007). Par ailleurs nos résultats ont également montré qu'un traitement au LPS augmente la proportion de réponses propres au TNP-ATP à une faible concentration  $\alpha$ meATP (1  $\mu$ M), ce qui indique une augmentation de l'activité des récepteurs P2X1/5. En **condition «LPS»,** la suramine (10  $\mu$ M) potentialise la réponse au BzATP (5  $\mu$ M) et cette réponse est inhibée par le 5-BDBD (10  $\mu$ M). On peut en déduire que suite au traitement LPS, la suramine inhibe les récepteurs P2X1/5 (dont l'activité ou expression a été augmentée par le traitement) ce qui révèle une action inhibitrice des récepteurs P2X1/5 sur les récepteurs P2X4. En effet, la suramine potentialise la réponse BzATP 5  $\mu$ M et cette réponse potentialisée est inhibée par le 5-BDBD. On peut donc en déduire que fonctionnellement, **les récepteurs P2X1/5 inhibent l'activité des récepteurs P2X4**. N.B. Cette interaction est difficile à détecter en condition contrôle (probablement parce que les cellules ne sont pas dans un état activé) mais se révèle clairement après un prétraitement au LPS.

Agoniste	Récepteurs P2X activés	Antagonistes 1 et 2	Récepteurs P2X bloqués	Récepteurs non affectés par antagonistes	Antagoniste 3	Récepteurs P2X non affectés par antago 1 + antago 2 + antago 3	effet de l'antagoniste 3 en présence des antago 1 et 2	Interprétation
BzATP (100 $\mu$ M)	P2X4, P2X5, P2X1/5 + P2X7 P2X1 et P2X3 désensibilisés	5-BDBD + TNP-ATP	P2X4 (80%) P2X1/5 P2X1 et P2X3 désensibilisés	P2X4 (20%), P2X5, P2X7	A740003 (10 $\mu$ M)	P2X4 (20%), P2X5	inhibition et blocage réponse BzATP 100 $\mu$ M	inhibition P2X7 diminue réponse P2X5 et P2X4 résiduelle

**Tableau 22** : Effet du A740003 (antagoniste P2X7) en présence de 5-BDBD –antagoniste P2X4) et de TNP-ATP (antagoniste P2X1, P2X3 et P2X1/5)

**Situation 3** : Le BzATP à forte concentration active tous les récepteurs P2Xs y compris P2X7. Néanmoins, à cette concentration, il est probable que les récepteurs P2X1 et P2X3 sont désensibilisés dès la première application de l'agoniste. En présence de 5-BDBD (10  $\mu$ M) et de TNP-ATP (10  $\mu$ M), l'application de A740003 (10  $\mu$ M), un antagoniste sélectif des récepteurs P2X7 produit un blocage ou une très forte inhibition des réponses au BzATP 100  $\mu$ M. Les cas de blocage (qui représentent 52% des cas (38/69)) indiquent à première vue que le A74005 bloque les réponses P2X7 et peut être les réponses P2X4 résiduelles et les réponses P2X5 (normalement insensible au cocktail de ces 3 antagonistes). Un effet de blocage direct des récepteurs P2X4 et P2X7 est cependant très peu probable car le A740003 n'a pas d'effet sur les autres récepteurs même à une concentration de 100  $\mu$ M (Honore et al., 2006). Par ailleurs dans nos expériences, des réponses au BzATP (100  $\mu$ M) de faible amplitude persistent dans 48% des cellules en présence de ces 3 antagonistes. Ces réponses impliquent probablement les récepteurs P2X5 et à la réponse résiduelle des récepteurs P2X4 (non bloquée par le 5-BDBD). Le fait que ces réponses soient toujours présentes indique que l'A740003 ne bloque pas directement ces réponses. Il semble donc que **le blocage des récepteurs P2X7 module (inhibe) les réponses P2X4 et P2X5.**

Agoniste	Récepteurs P2X activés	Antagonistes 1 et 2	Récepteurs P2X bloqués	Récepteurs non affectés par antagonistes	Antagoniste 3	Récepteurs P2X non affectés par antago 1 + antago 2 + antago 3	effet de l'antagoniste 3 en présence des antago 1 et 2	Interprétation
BzATP (100 $\mu$ M)	P2X4, P2X5, P2X1/5 + P2X7 P2X1 et P2X3 désensibilisés	5-BDBD + TNP-ATP	P2X4 (80%) P2X1/5 P2X1 et P2X3 désensibilisés	P2X4 (20%), P2X5, P2X7	BBG 10 $\mu$ M	P2X4 (20%)	inhibition faible réponse BzATP 100 $\mu$ M + potentialisation réponse BzATP 100 $\mu$ M	P2X5 inhibe P2X4

**Tableau 23 :** Effet du BBG (antagoniste P2X7 et P2X5) en présence de 5-BDBD (antagoniste P2X4) et de TNP-ATP (antagoniste P2X1, P2X3 et P2X1/5)

**Situation 4 :** Le Brilliant Blue G (BBG) est connu en tant qu'antagoniste des récepteurs P2X7 de rat, mais il s'avère que le BBG n'a que très peu ou pas d'effet sur le récepteur P2X7 de souris et P2X7 humain (Donnelly-Roberts et al., 2009). Par contre le BBG inhibe le récepteur P2X5 humain avec un IC<sub>50</sub> de 2.9  $\mu$ M (Bo et al., 2003). En présence de 5-BDBD (10  $\mu$ M) et de TNP-ATP (10  $\mu$ M), le BBG (10  $\mu$ M) ne bloque que très peu de réponses au BzATP 100  $\mu$ M (5% des cas (3/62)). Par ailleurs le BBG provoque quelques inhibitions (27% (17/62)) mais on voit surtout apparaître des potentialisations de la réponse BzATP (100  $\mu$ M) dans 25% des cellules (16/62). Des potentialisations de la réponse BzATP (100  $\mu$ M) n'ont jamais été observées avec le A740003 dans les mêmes conditions expérimentales (voir situation 3 ci-dessus). L'effet du BBG sur la potentialisation de la réponse BzATP semble donc lié au blocage du récepteur P2X5 plutôt qu'à un effet sur le récepteur P2X7. On peut donc spéculer que dans les conditions physiologiques **le récepteur P2X5 inhibe l'activité du récepteur P2X4 et/ou du récepteur P2X7** (directement ou indirectement).

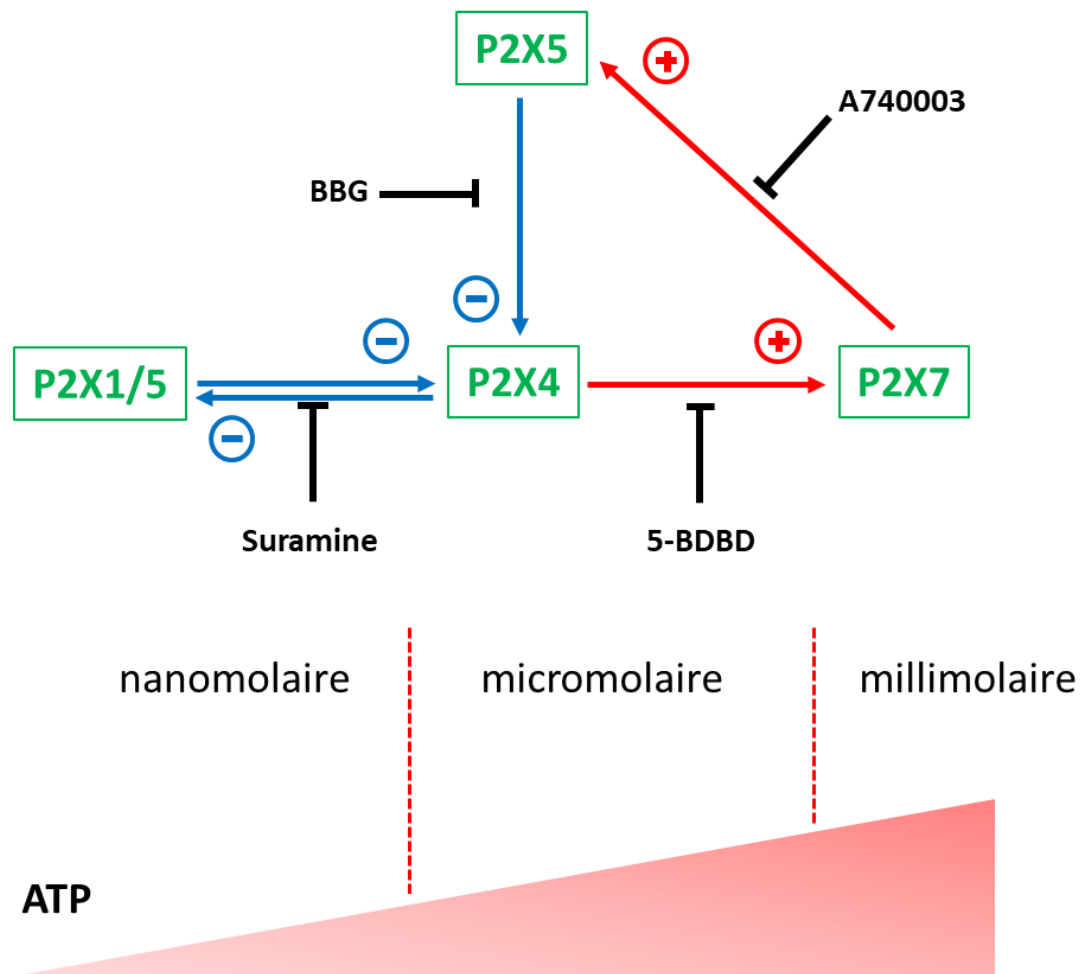
#### VII.1.4 Effets de prétraitements au LPS ou à l'IL-4

Un prétraitement au LPS a augmenté significativement les réponses au  $\alpha\beta$ meATP (1 $\mu$ M) ainsi qu'à l'ATP 1  $\mu$ M et 20  $\mu$ M. Par ailleurs, nous avons observé une augmentation de la proportion de cellules avec une réponse propre au TNP-ATP. Ces résultats peuvent s'expliquer par une augmentation de l'expression ou de l'activité des récepteurs P2X1/5. De manière surprenante, la proportion de réponses à l' $\alpha\beta$ meATP à forte concentration (100  $\mu$ M) diminue significativement. Ceci est étonnant car dans la littérature il est rapporté que l'expression de l'ARNm et de la

protéine P2X4 augmente après traitement au LPS (Raouf et al., 2007). Les deux aspects ne sont cependant pas incompatibles car l' $\alpha\beta\text{meATP}$  100  $\mu\text{M}$  va activer les récepteurs P2X1/5 et partiellement (faiblement) les récepteurs P2X4. Par conséquent, il se pourrait que les récepteurs P2X1/5 inhibent les récepteurs P2X4 et que les récepteurs P2X4 inhibent en retour les récepteurs P2X1/5.

#### VII.1.5 Schéma de synthèse et conclusion sur les interactions entre récepteurs P2Xs dans les cellules BV-2

A partir de l'ensemble ces données on peut élaborer un schéma des interactions fonctionnelles entre les différents types de récepteurs dans les cellules BV-2 (cf schéma de synthèse ci-dessous).



*Figure 67 : Schéma de synthèse et de conclusion, basé sur nos données expérimentales, sur les interactions entre récepteurs P2Xs dans les cellules microgliales murines BV-2.*

Ce schéma tient compte de l'ensemble des observations présentées dans les paragraphes précédents.

1) En présence de 5-BDBD (10  $\mu$ M) qui bloque 80% de P2X4, le TNP-ATP (10  $\mu$ M) ou la suramine (10  $\mu$ M) potentialisent la réponse P2X4 résiduelle (voir situations 1 et 2 ci-dessus), donc P1X1/5 inhibe normalement P2X4. La relation inhibitrice inverse de P2X4 sur P2X1/5 est mise en évidence après prétraitement au LPS (voir paragraphe «Effets de prétraitements au LPS ou à l'IL-4» ci-dessus).

2) L'effet des récepteurs P2X4 sur les récepteurs P2X7, n'a pas été mis en évidence directement dans nos expériences mais est bien documenté, les récepteurs P2X4 facilitant les récepteurs P2X7 ([Kanellopoulos et al., 2021](#)).

3) Le blocage du récepteur P2X7 par l'A740003 va globalement faciliter la réponse P2X4. Le blocage de P2X7 va diminuer l'effet facilitateur de P2X7 sur P2X5 et par voie de conséquence la diminution de l'activité de P2X5 va diminuer l'effet inhibiteur de P2X5 sur P2X4 (situation 3 ci-dessus).

4) L'inhibition de P2X5 par le BBG sans inhibition de P2X7 va mener à une facilitation de P2X4 (situation 4).

#### VII.1.6 Signification physiologique des interactions entre récepteurs P2Xs dans la détection de l'ATP extracellulaire.

Les récepteurs P2X1/5 sont sensibles à de concentrations nanomolaires d'ATP, les récepteurs P2X4 et P2X5 détectent des concentrations micromolaires modérées et P2X7 des concentrations micromolaires élevées ou millimolaires. Ces récepteurs permettent donc de détecter l'ATP sur une large palette de concentrations.

On peut spéculer que les interactions fonctionnelles entre les différents récepteurs servent à «filtrer» et à affiner la détection des concentrations extracellulaires d'ATP.

En effet à faible concentration d'ATP les récepteurs P2X1/5 sont activés mais ils empêchent ou limitent l'activation des récepteurs P2X4 (notamment aux concentrations seuils de l'activation de P2X4). Lorsque la concentration est micromolaire les récepteurs P2X1/5 et les récepteurs P2X4 sont activés, mais la contribution de P2X1/5 est réduite du fait de l'action négative de P2X4. De plus l'inhibition de P2X4 par P2X1/5 est contournée par l'activation directe de P2X4 à des concentrations micromolaires. Lorsque la concentration augmente le récepteur P2X4 va de plus en plus faciliter l'activation du récepteur P2X7. Ce phénomène va néanmoins activer une boucle de rétrocontrôle impliquant le récepteur P2X5. En effet P2X7 stimule P2X5 qui à son tour inhibe P2X4 ce qui permet de filtrer/d'extraire la réponse P2X7. Lorsque l'ATP atteint des concentrations millimolaires, les récepteurs P2X7 sont directement activés et les récepteurs P2X4 sont inhibés via la boucle de rétroaction impliquant P2X5.

**En conclusion**, les cellules microgliales BV-2 expriment un ensemble de récepteurs-canaux de l'ATP. Ces cellules expriment P2X1/5, P2X4, P2X5 et P2X7. A ces récepteurs il faut probablement ajouter une faible fraction de récepteurs P2X1 et P2X3 homomériques. Par ailleurs les profils pharmacologiques des réponses pourraient indiquer la présence de récepteurs hétéromériques P2X1/3 et/ou P2X3/5.

Ces récepteurs sont fonctionnels et interagissent entre eux pour réguler la sensibilité de détection de l'ATP extracellulaire. Ces interactions sont susceptibles de subir des changements plastiques à **court terme** suite à des phosphorylations, déphosphorylations, internalisations, augmentations de l'adressage membranaire des différents récepteurs P2Xs ou à **long terme** notamment en cas de changements d'expressions des différents sous-types de récepteurs P2Xs. De tels changements pourraient avoir lieu durant des situations de neuroinflammation, dans le cadre du développement de maladies neurodégénératives (douleurs neuropathiques, maladie d'Alzheimer, maladie de Parkinson, ...) ou durant le vieillissement normal ou pathologique.



## VII.2 Discussion CaSR

Le récepteur sensible au calcium extracellulaire est exprimé abondamment dans la glande parathyroïde et dans le rein, où il joue un rôle clé dans l'homéostasie du calcium ([Hannan et al., 2019](#)). Il est également exprimé dans d'autres tissus où son rôle précis reste encore à définir. Il est notamment exprimé par les cellules immunitaires périphériques (monocytes, macrophages) ([Zhai et al., 2017](#)) ([Ren et al., 2020](#)) et prend part à la réponse inflammatoire ([Iamartino et Brandi, 2022](#)).

Son expression a également été démontrée dans le système nerveux central ([Bandyopadhyay, Tfelt-Hansen et Chattopadhyay, 2010](#)), notamment les neurones, les astrocytes réactifs et les oligodendrocytes. En revanche son expression fonctionnelle dans les cellules microgliales est débattue. En effet, seuls deux articles montrent son expression dans la microglie ([Chattopadhyay et al., 1999](#)) ([Wang et al., 2020](#)) alors que tous les autres articles n'y font pas référence ou disent qu'elle ne l'exprime pas ([Noh et al., 2015](#)).

Durant notre étude sur l'impact du calcium sur les cellules microgliales BV-2, notamment en terme de polarisation microgliale, nous nous sommes rapidement rendu compte que :

- Les cellules BV-2 changent de morphologie lorsque la concentration de calcium extracellulaire varie (analyse morphologique et observations non quantifiées en imagerie du calcium libre extracellulaire).
- Lorsque le calcium extracellulaire augmente, le calcium intracellulaire cytoplasmique augmente également (imagerie du calcium).

Compte tenu de ces observations, nous nous sommes intéressés à l'expression du CaSR par les cellules microgliales BV-2 ([Paccou et al., 2014](#)).

En périphérie, le CaSR est exprimé de façon basale par les cellules immunitaires, mais son expression totale augmente en cas de pathologie ([Paccou et al., 2014](#)). Dans le système nerveux central, son expression est indétectable sur les astrocytes en condition basale, mais ils l'expriment en conditions pathologiques ([Pak et al., 2016](#)). Il semble donc qu'il y ait un consensus concernant l'expression du CaSR par les cellules participant à la réponse inflammatoire, que ce soit en périphérie (monocytes, macrophages) ou dans le système nerveux central (astrocytes et peut être

microglie). Son expression est faible en condition physiologique et elle augmente en cas de dérèglement (Pak et al., 2016) (Paccou et al., 2014). Nos résultats concernant l'expression totale du CaSR par les cellules BV-2 vont également dans ce sens (Figure 46 et 47). En effet une stimulation au LPS (25ng/ml) pendant 24h suffit à augmenter l'expression totale du CaSR, on passe d'une intensité moyenne de  $28,39 \pm 1,077$  u.a (contrôle) à  $36,67 \pm 1,83$  u.a (LPS 25ng/ml, 24h).

Nos expériences d'imagerie du calcium libre intracellulaire montrent que le récepteur est présent sur ces cellules et qu'il est bien fonctionnel (Figure 48). En revanche, peu importe l'agoniste que nous avons utilisé, nous avons toujours observé une plus grande proportion de réponses dans les cultures BV-2 non traitées par rapport à celles traitées avec le LPS (Figure 48). Cela pourrait être dû à la concentration cytoplasmique de calcium qui est plus élevée dans des cellules activées (nos observations + (Pan et Garaschuk, 2022)) ou à des différences plus fines dans l'expression du CaSR, non discernables avec une analyse sur cellule entière (intensité totale). Ce récepteur cycle très rapidement à la membrane plasmique et sera internalisé, d'abord dans les endosomes où il va continuer à signaler, puis il est dégradé dans les lysosomes (Ray, 2015).

Nos analyses de l'expression du récepteur dans la partie subplasmalemmale (région membranaire et sous membranaire) montre qu'il est plus exprimé «à la membrane» en condition « contrôle » qu'en condition « LPS » (Figure 49). Après traitement au LPS on a une diminution de 23,7% de l'expression du CaSR dans la région subplasmalemmale. Ce chiffre est voisin de celui de la diminution de la proportion de cellules qui répondent au  $Gd^{3+}$  (baisse de 40,9% et au R568 (baisse de 14,1%). Ces données vont dans le sens d'une expression membranaire plus forte en condition « contrôle » qu'en condition stimulée par le LPS.

De nombreuses études affirment que la stimulation du CaSR engendre une activation cellulaire (Lee et al., 2012) (Iamartino et Brandi, 2022). Cette activation peut être visualisée de différentes façons. Nous avons fait le choix d'utiliser une analyse morphologique. Lors de l'activation la cellule microgliale quiescente (primaire ou BV-2) passe d'une morphologie allongée, avec un ou plusieurs prolongements à une morphologie ronde. Ce changement est facilement détectable et quantifiable en microscopie photonique conventionnelle. Pour caractériser plus en détail le

changement de phénotype nous avons également des marquages immunocytochimique pour CD68 (marqueur pro-inflammatoire) et CD206 (marqueur anti-inflammatoire) ainsi qu'un dosage des cytokines sécrétées.

Concernant les changements morphologiques, après activation du CaSR, on observe une augmentation du nombre de cellules rondes après traitement (Figure 52 et 53). Ce changement morphologique est associé avec une activation microgliale. Il est similaire au changement morphologique que nous observons après avoir incubé nos cellules BV-2 avec du LPS (25ng/ml) pendant 24h. De plus, ce changement morphologique induit par le R568 est inhibé par un modulateur allostérique négatif du CaSR, le NPS 2143 (Figure 54 et 55) mais n'est pas affecté par le résatorvid (Tak-242), un antagoniste du récepteur TLR4) ni par l'IL-4 (Figure 56). Ces données suggèrent que les changements morphologiques médiés par les agonistes du CaSR n'impliquent pas l'activation de TLR-4 et ne sont pas affectés par l'IL-4. En revanche, et de façon intéressante, lorsque les cellules BV-2 sont incubées avec du LPS (25ng/ml) le changement morphologique induit par le LPS est partiellement, mais significativement, atténué par le NPS 2143 (1 $\mu$ M). Ceci suggère que le LPS (via TLR4) est capable de transactiver le CaSR.

Ces deux récepteurs partagent des voies de transduction intracellulaires, ce qui pourrait expliquer cette transactivation ou convergence. Tous les deux peuvent activer les voies ERK1/2, JNK, p38 (MAP kinases) et NF- $\kappa$ B impliquées dans des processus cellulaires tels que la multiplication et la différenciation, l'expression de molécules pro- ou anti-inflammatoires et la mort cellulaire par apoptose. Lorsqu'on inhibe la voie p38, on bloque totalement les changements morphologiques engendrés par l'activation du TLR-4 (avec du LPS à 25ng/ml, 24h), ou par l'activation du CaSR (R568, 1 $\mu$ M, 24h)

Le CaSR peut être couplé à différentes protéines G effectrices, en fonction des tissus et en fonction de l'environnement cellulaire (physiologique ou pathologique). Ce RCPG peut agir par l'intermédiaire de  $G_{i/o}$ ,  $G_{q/11}$  ou  $G_{12/13}$  (Hannan et al., 2019). Dans les cellules cancéreuses il peut également activer la protéine  $G_s$  (Mamillapalli et al., 2008).

Une stimulation de  $G_{q/11}$  va augmenter le calcium cytoplasmique ainsi que l'activation de la PKC, qui va pouvoir phosphoryler de nombreuses protéines, dont le CaSR lui-même sur la tyrosine 888. L'augmentation de calcium et l'activation de la PKC peuvent participer au changement morphologique observé après son activation. Finalement  $G_{q/11}$  peut également recruter Rho A. Ce recrutement qui peut également avoir lieu après stimulation de  $G_{12/13}$ . Les petites protéines G Rho sont impliquées dans la réorganisation du cytosquelette d'actine impliqué dans les changements morphologiques, l'adhésion et la migration cellulaire ainsi que la progression dans le cycle cellulaire. Finalement  $G_{i/o}$  va également pouvoir modifier la morphologie cellulaire en diminuant par exemple la concentration cytoplasmique d'AMP cyclique ou en phosphorylant les MAP kinases ERK1/2.  $G_{12/13}$  peut activer l'adénylate cyclase 7, ce qui va induire une augmentation d'AMP cyclique (Voir Partie Introduction CaSR).

Nous avons inhibé sélectivement chacune de ces voies, ou les trois à la fois pour évaluer leurs impacts respectifs dans les changements morphologiques qui sont corrélés avec une activation cellulaire. Lorsque ces voies sont inhibées une à une, on limite les changements morphologiques induits par l'augmentation du calcium extracellulaire (10mM). Même si la proportion de cellules allongées est significativement supérieure à celle observée en condition  $Ca^{2+}$  seul, il faut une inhibition simultanée des 3 voies de transduction pour obtenir un blocage total des changements morphologiques et un retour à une proportion comparable à celle observée en condition «contrôle» (sans activation du CaSR). Ces trois voies peuvent donc influencer de manière convergente la morphologie des cellules BV-2. Il serait intéressant de tester l'effet de chacune des voies sur les différents phénomènes regroupés sous le terme d'activation microgliale (division cellulaire, migration, adhésion, phagocytose...). Si les différents aspects de l'activation sont contrôlés par des voies de transduction différentes, on peut envisager l'utilisation d'agonistes/antagonistes biaisés du CaSR pour moduler spécifiquement différentes composantes de l'activation microgliale (Figure 59).

Il se pourrait également que le changement morphologique soit indépendant de la signalisation TLR-4, mais que l'activation du TLR-4 par le LPS stimule la sécrétion de cytokines qui à leur tour vont augmenter l'expression du CaSR et induire les changements morphologiques observés (Hendy et Canaff, 2016).

### VII.2.1 Les changements morphologiques pourraient être dépendants du CaSR et non de TLR-4

Dans le modèle que nous utilisons, le LPS (25ng/ml) va modifier la morphologie des cellules BV-2 qui vont exprimer des marqueurs d'activation et sécréter diverses cytokines impliquées dans la médiation/propagation de l'inflammation.

Parmi les cytokines que les cellules BV-2 sécrètent, après incubation pendant 24h avec du LPS (25ng/ml) il y a notamment l'IL-6 (Figure 67 et Tableau 16) qui va pouvoir se fixer sur son récepteur et activer la voie JAK. En effet, l'IL-6 est une molécule soluble qui va diffuser dans le milieu extracellulaire et pourra agir de façon autocrine ou paracrine et propager ainsi l'inflammation.

Après activation, JAK va phosphoryler STAT1-3, qui va être transloquée dans le noyau et initier la transcription de plusieurs gènes dont le CaSR (Hendy et Canaff, 2016). Ce phénomène peut expliquer pourquoi l'expression totale du CaSR est augmentée après incubation des cellules BV-2 avec du LPS (25ng/ml, 24h) (Figure 46 et 47). De plus, l'activation du CaSR engendre une augmentation du calcium cytoplasmique ainsi qu'une diminution de l'AMP cyclique, pouvant promouvoir l'assemblage de l'inflammasome NLRP3 et la propagation des signaux inflammatoires dans les macrophages périphériques (Paccou et al., 2014) et les astrocytes réactifs (Pak et al., 2016).

Nous avons vérifié l'implication du CaSR exprimé par les cellules microgliales BV-2 dans la polarisation microgliale.

A notre grande surprise, le R568 va favoriser l'expression de CD206, marqueur anti-inflammatoire et ne va pas augmenter l'expression de CD68, dont l'expression augmente dans un état pro-inflammatoire (Figure 62, 63, 64, 65). Le NPS2143 va produire l'effet inverse : on observe une augmentation de CD68 et pas de changement de CD206.

Lorsque des cellules BV-2 sont traitées simultanément avec du LPS et du R568, les cellules adoptent une morphologie ronde, mais du point de vue des marqueurs membranaires exprimés, elles maintiennent un phénotype anti-inflammatoire (augmentation de CD206 et diminution de CD68).

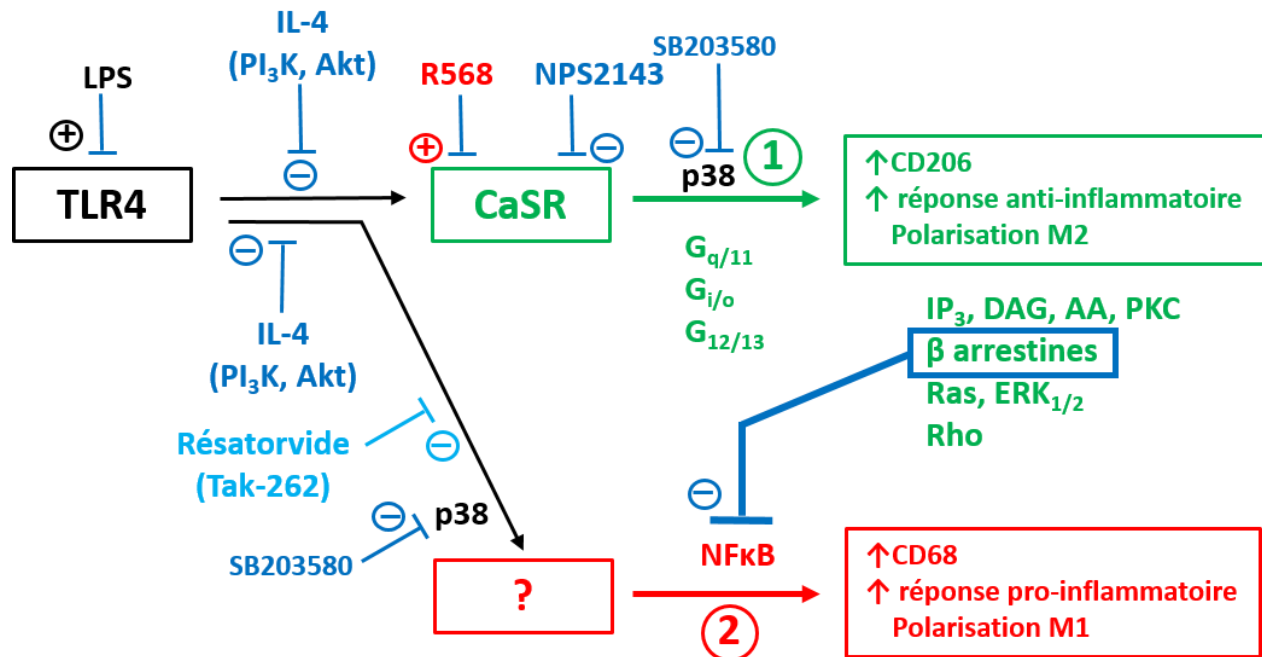


Figure 68 : Schéma hypothétique des interactions indirectes entre la signalisation TLR-4 et le CaSR.

Ce phénotype « hybride » d'activation microgiale pourrait s'expliquer par :

- L'agonisme biaisé du CaSR
- Une spécificité cytotogique de la signalisation du CaSR, comme par exemple le couplage à une protéine G spécifique (comme cela a été reporté dans les cellules cancéreuses (Mamillapalli et al., 2008)) ou l'expression préférentielle d'un type d'adénylate cyclase

#### VII.2.2 L'activation du CaSR microgial pourrait activer l'adénylate cyclase 7 (par l'intermédiaire de la protéine $G_{12/13}$ )

Lorsque les cellules sont incubées avec du LPS (25ng/ml, 24h) et du R568 (1 $\mu$ M, 24h), l'expression du CD68 diminue et celle de CD206 augmente. Normalement, l'activation du CaSR diminue la quantité d'AMP cyclique cytoplasmique par l'activation des protéines  $G_{i/o}$ , phénomène nécessaire

à l'assemblage de l'inflammasome NLRP3. Mais son activation peut également activer  $G_{12/13}$  qui va activer l'adénylate cyclase 7 et ainsi stimuler la production d'AMP cyclique au lieu de l'inhiber.

Les cellules microgliales primaires et les cellules BV-2 expriment majoritairement l'adénylate cyclase 7 ((Bennet et al., 2016) et <http://www.brainrnaseq.org/>), la stimulation du CaSR va augmenter la concentration d'AMP cyclique et/ou de calcium libre intracellulaire cytoplasmique. L'élévation de calcium intracellulaire ou/et d'AMP cyclique dans le cytoplasme pourraient rendre compte du changement morphologique des cellules (cellules allongées deviennent rondes) (Bernier et al., 2019), sans pour autant induire un phénotype pro-inflammatoire au plan moléculaire. Cela coïncide avec nos observations morphologiques et avec l'augmentation de l'expression de CD206 (cellules rondes avec marqueur anti inflammatoire).

Si dans les cellules microgliales, le CaSR couple préférentiellement à  $G_{12/13}$  du fait de la présence abondante de l'adénylate cyclase 7 (Bennet et al., 2016), qui est l'isoforme majeure exprimée par la microglie murine et humaine (<http://www.brainrnaseq.org/>), alors l'activation du CaSR inhiberait bien les effets du LPS sur les cellules microgliales BV-2 (Figure 62, 63, 64, 65). Nos résultats vont dans le sens de cette hypothèse car nous observons bien une diminution des marqueurs pro-inflammatoires lorsque les cellules BV-2 sont co-incubées avec du LPS (25ng/ml) et du R568 (1 $\mu$ M) pendant 24h (Figure 62 et Figure 61).

### VII.2.3 Le CaSR exprimé par les cellules BV-2 pourrait être couplé à $G_s$

La lignée microgliale BV-2 a été générée par immortalisation de cellules microgliales primaires (rétrovirus *v-raf/v-myc*) (Blasi et al., 1990). Les rétrovirus sont des virus oncogènes et peuvent donner des cancers (Lee et Reddy, 1999). Notre lignée cellulaire BV-2 pourrait donc, après activation du CaSR, coupler à  $G_s$  comme cela a précédemment été décrit pour les cellules cancéreuses (Mamillapalli et al., 2008).

Le couplage à la protéine  $G_s$  augmente également la concentration d'AMPc cytoplasmique (Mamillapalli et al., 2008), ce qui pourrait expliquer le phénotype que nous observons pour nos cellules BV-2 (morphologies rondes, avec une expression accrue de CD206).

Il n'est pas à exclure que dans les cellules microgliales le CaSR couple à plusieurs protéines G. En effet, lorsque nous inhibons sélectivement  $G_{i/o}$ ,  $G_{q/11}$  ou la voie des MAP kinases, on retrouve une morphologie similaire à la condition « contrôle » (Figure 59). Mais l'activation de ces voies, ne stimule pas la synthèse d'AMPc, mais la réprime au contraire.

Il pourrait sembler improbable qu'un RCPG couple en même temps à  $G_{i/o}$  et  $G_s$ , ayant des effets radicalement opposés par rapport à l'AMPc (diminution et augmentation). Plusieurs études montrent que certains RCPG (récepteur D1 de la dopamine, des opioïdes et de la prostacycline) peuvent recruter  $G_{i/o}$  et/ou  $G_s$  (Sidhu et al., 1991) (Cruciani et al., 1993) (Lawler, Miggin et Kinsella, 2001).

De plus, un récepteur chimérique de l'adénosine pouvant coupler à  $G_{i/o}$  et  $G_s$ , exprimé dans des cellules HEK293 montre que la stimulation de l'adénylate cyclase ( $G_s$ ) prédomine sur son inhibition ( $G_{i/o}$ ) (Tucker et al., 2000).

Il est donc raisonnable d'envisager que dans nos cellules BV-2, la stimulation du CaSR active plusieurs protéines G, inhibitrices et stimulatrices. L'activation du CaSR peut alors augmenter le calcium intracellulaire par la protéine  $G_{i/o}$  (par la PLC), par exemple, et augmenter l'AMPc intracellulaire par l'activation de  $G_s$  (ou par  $G_{12/13}$ ) (Tucker et al., 2000).

L'activation des cellules BV-2 avec du LPS (25ng/ml) pendant 24h est suffisante pour induire un phénotype pro-inflammatoire (changements morphologiques, marqueurs membranaires et molécules sécrétées) (Partie «résultats»). Bien que la sécrétion d'IL-6 après activation des cellules BV-2 pourrait être suffisante pour augmenter l'expression totale du CaSR (Figure 46 et 47), la concentration en  $Ca^{2+}$  (1,8 mM) dans notre milieu de culture n'est pas suffisante pour l'activer pleinement. L'ajout de R-568 (1 $\mu$ M), un modulateur allostérique positif du CaSR, suffit à augmenter l'activation du CaSR. Cela pourrait stimuler différentes protéines G et augmenter la concentration intracellulaire d'AMP cyclique (grâce à la protéine  $G_s$  et  $G_{12/13}$ ) et en parallèle augmenter le calcium cytoplasmique (par  $G_{i/o}$  et  $G_{q/11}$ ). L'augmentation de la concentration d'AMPc est impliquée dans l'initiation de la résorption de l'inflammation (Tavares et al., 2020), notamment en inhibant l'assemblage de l'inflammasome NLRP3 nécessaire à la sécrétion d'IL-1 $\beta$



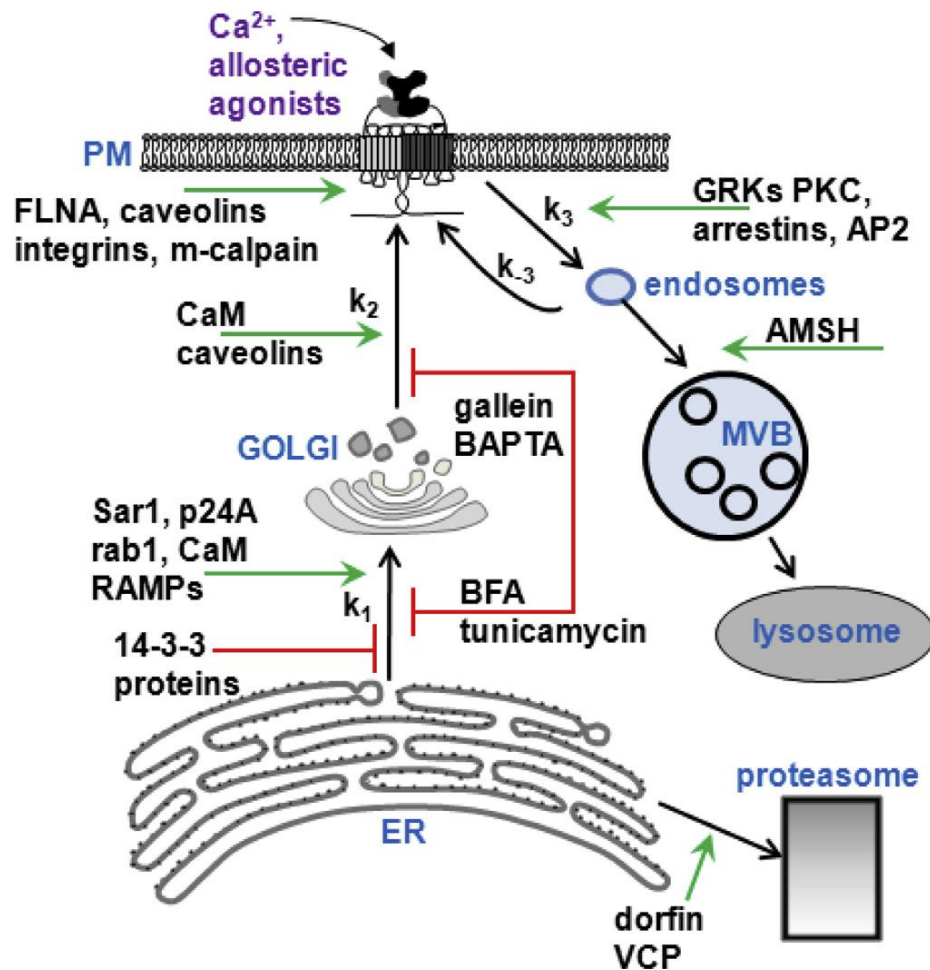
mature. Ce phénomène pourrait potentiellement passer par l'inhibition des phénomènes moléculaires pro-inflammatoires initiés par l'activation de TLR-4 par le LPS.

### VII.3 Interactions potentielles entre la signalisation purinergique et le CaSR

Dans les parties précédentes de la discussion nous avons abordé la présence et la fonctionnalité du CaSR et de différents types de récepteurs P2X de l'ATP.

Ci-dessous, nous allons envisager les interactions potentielles entre ces deux types de récepteurs. Nous n'avons, pour l'instant, pas évalué expérimentalement ces interactions, mais un certains nombres d'indications suggèrent qu'une telle interaction est possible.

Le CaSR est caractérisé par le fait que contrairement à la majorité des récepteurs couplés aux protéines G, il désensibilise très peu lors de la présence continue de l'agoniste (Grant et al., 2011). Ceci est important pour un récepteur qui doit détecter en permanence de faible variation de la concentration d'agoniste alors que le récepteur est déjà activé de manière importante. Pour assurer cette fonction, le CaSR est en permanence adressé à la membrane (Breitwieser, 2013). Cet adressage est régulé alors que l'endocytose du récepteur est relativement constant. La disponibilité du récepteur est donc principalement dépendante de l'insertion de nouveaux récepteurs à la membrane (Breitwieser, 2013). Ce contrôle de l'insertion dépend de la glycosylation du récepteur dans l'appareil de Golgi (Grant et al., 2011) et de l'action de différentes protéines intracellulaires telles que des petites protéines G monomériques (Rabs, SAR1, A2RFs), de récepteurs cargo et de protéines chaperonnes (p24A, RAMPs) et de protéines d'interaction (protéines 14-3-3, calmoduline) (Breitwieser, 2013). Ce phénomène d'adressage et d'insertion de nouveaux récepteurs en fonction de la concentration extracellulaire d'agoniste a été appelé « Agonist-Driven Insertional Signalling » (ADIS) est illustré dans la figure ci-dessous (Figure 69) (Breitwieser, 2013).



*Figure 69: Cycle du CaSR et ADIS (Agonist-Driven Insertional Signalling). Les protéines ou les agents pharmacologiques inhibant sont trafique cellulaire sont en rouge, celles le favorisant en vertes. (Breitwieser, 2013)*

De manière intéressante, l'insertion membranaire du CaSR est favorisée par la calmoduline alors que l'internalisation de la PKC et des arrestines. Par conséquent une augmentation de Ca<sup>2+</sup> intracellulaire produite par d'autres récepteurs que le CaSR est susceptible d'influencer l'ADIS en jouant sur l'insertion ou/et l'internalisation du CaSR.

Les récepteurs P2Xs sont fortement perméables aux ions Ca<sup>2+</sup> (Egan et Khakh, 2004) et leur activation va induire une augmentation de la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> en absence de l'activation de la voie IP<sub>3</sub>/DAG. Le Ca<sup>2+</sup> peut se lier à la calmoduline et activer la calmoduline kinase II (CaMKII). Comme indiqué

dans le schéma de la figure 69, ci-dessus, la calmoduline (CaM) joue exclusivement un rôle dans l'insertion de nouveaux récepteurs à la membrane plasmique alors que la PKC et les arrestines recrutées après stimulation d'un récepteur couplé à la phospholipase C (comme le CaSR par exemple) vont promouvoir l'internalisation clathrine-dépendante du CaSR (avec recrutement du facteur AP2). L'activation des récepteurs P2Xs à de faibles concentrations d'ATP (P2X1/5 et P2X4) va donc probablement faciliter l'expression membranaire du CaSR. Aux plus fortes concentrations d'ATP qui vont activer P2X7 les élévations fortes de la  $[Ca^{2+}]_i$  pourraient mettre en jeu d'autres phénomènes (libération de cytokines pro-inflammatoires) pouvant éventuellement s'opposer à l'ADIS.

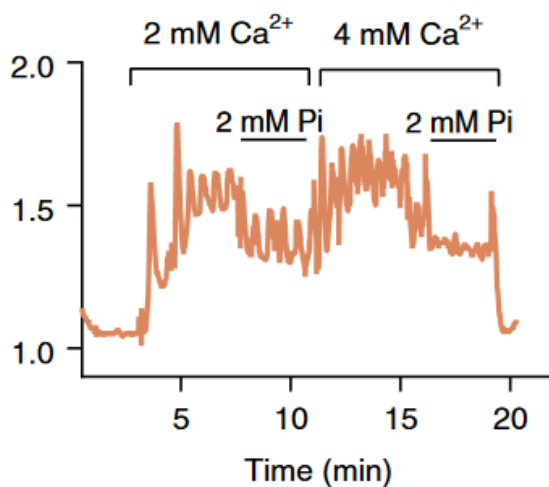
Il faut noter que dans nos expériences d'imagerie du calcium, l'application d'agonistes des récepteurs P2X (et n'activant pas P2Y) tels que l'abme ATP (1  $\mu$ M) ou le BzATP (10  $\mu$ M) ont induit en quelques minutes un déplacement des cellules BV-2 vers la source d'agoniste s'accompagnant d'une rétraction des prolongements. Ainsi, la stimulation des récepteurs P2X, notamment des récepteurs P2X1/5 (par l' $\alpha\beta$ MeATP) a induit un phénotype arrondi dans les cellules BV-2. Le même phénomène a été observé dans des expériences de morphologie lors d'une exposition de 24h à de l'ATP (10  $\mu$ M) ajoutée au milieu de culture avant l'évaluation de la morphologie des cellules. Il reste à déterminer si les effets de la stimulation des récepteurs P2X sont liés à la stimulation ou à l'insertion du CaSR à la membrane. Ce point pourra être vérifié en testant les effets du NPS2143 (modulateur allostérique du CaSR) sur les changements morphologiques induits par différents agonistes des récepteurs P2X.

L'ATP et l'ADP extracellulaire sont également susceptibles d'activer les récepteurs P2Y. Les cellules BV-2 expriment des ARNm pour P2Y1, P2Y2, P2Y6, P2Y11 et P2Y13 (Brautigam et al., 2005) (Gendron et al., 2003). Parmi ces récepteurs, le récepteur P2Y2 peut être activé par l'ATP et l'UTP, le récepteur P2Y6 est un récepteur pour l'ADP et les autres récepteurs ont une plus forte affinité pour l'ADP que pour l'ATP (von Kügelgen et Harden, 2011). En ce qui concerne le couplage intracellulaire, P2Y1, P2Y2 et P2Y6 activent la PLC via une protéine Gq/11 alors que P2Y12 et 13 qui ont une forte affinité pour l'ADP et qui ont été impliqués dans la physiologie microgliale (Haynes et al., 2006) (Honda et al., 2001) (Irina et al., 2008) (Bernier et al., 2019) sont couplés négativement à l'adénylate cyclase par l'intermédiaire d'une protéine Gi l'ATP (von Kügelgen et

[Harden, 2011](#)). Dans nos expériences, l'élévation de la  $[Ca^{2+}]_i$  induite par l'ATP (20  $\mu$ M) ou l'ADP (20  $\mu$ M) a toujours été bloquée par le N449 un antagoniste des récepteurs P2X renfermant la sous unité P2X1, ce qui suggère que des récepteurs P2Y couplés à la PLC ou induisant indirectement une élévation de la  $[Ca^{2+}]_i$  par un autre effecteur intracellulaire ne sont pas impliqués. Nous n'avons pas mesuré les variations de concentration intracellulaire d'AMPC intracellulaire, mais l'activation de P2Y12 et P2Y13 sont susceptibles de diminuer cette concentration. Ce point devra être vérifié dans de futures expériences en mesurant par exemple les changements d'AMPC dans des cellules uniques avec une bonne résolution temporelle grâce à des sondes fluorescentes intracellulaires ([Bonnot et al., 2014](#)).

Il est intéressant que la voie activée par P2Y12 et P2Y13 soit semblable à celle activée par le CaSR pour sa composant  $G_i$  sensible à la toxine pertussique. On peut donc spéculer que les effets de P2Y12/P2Y13 et de CaSR pourraient être additifs, voire synergiques.

Une autre possibilité d'interaction entre les nucléotides extracellulaires et le CaSR concerne le phosphate inorganique. En effet, le CaSR est modulé par un grand nombre de molécules extracellulaires. Parmi ces molécules, on retrouve le phosphate inorganique ( $P_i$ )(Figure 70). Il est décrit comme stimulant la sécrétion de parathormone in vitro et in vivo ([Centeno et al., 2019](#)) en inhibant le CaSR ([Centeno et al., 2019](#)). Le  $P_i$  est également produit lors de la dégradation extracellulaire de l'ATP par les ectonucléotidases et pourrait inhiber le fonctionnement du CaSR dans un grand nombre de tissus, y compris le système nerveux.



*Figure 70 : Variation du calcium intracellulaire libre, avec ou sans  $P_i$  dans le milieu extracellulaire. Le  $P_i$  inhibe l'augmentation de calcium cytosolique. ([Centeno et al., 2019](#))*

Nos données montrent qu'il existe un tonus d'ATP/ADP dans les conditions basales. En effet l'application de suramine diminue la  $[Ca^{2+}]_i$  des cellules BV-2 en condition « contrôle » (en absence de stimulation des récepteurs P2X. Dans notre système la suramine inhibe les récepteurs P2X1/5 qui détectent de très faibles concentrations d'ATP. Etant donné que les cellules BV-2 sont cultivées sur du verre et en absence d'un autre type cellulaire, l'ATP détectée provient de la sécrétion d'ATP par les cellules BV-2 elles-mêmes. Il est donc probable que cette ATP soit métabolisée dans le milieu extracellulaire par les ectonucléotidases et que chaque molécule d'ATP génère 3 molécules de Pi (après dégradation successive et rapide en ADP, AMP et adénosine). Ceci constitue un mécanisme d'amplification pour la détection de la quantité d'ATP par les cellules. Ces molécules de Pi vont ainsi inhiber topiquement la fonction du CaSR constituant un rétrocontrôle négatif sur l'ADIS. Toute augmentation de libération d'ATP par les cellules microgliales et les tissus environnant va augmenter également la concentration de Pi extracellulaire et donc inhiber l'activité du CaSR. L'augmentation de la  $[Ca^{2+}]_i$  induite par l'activation des récepteurs P2X va d'une part stimuler l'insertion de nouveau CaSR à la membrane. On peut spéculer que cette stimulation puisse en retour être contrôlée sous l'effet de l'ATP libérée par les cellules BV-2 par l'intermédiaire de l'inhibition du CaSR par le Pi généré par le métabolisme extracellulaire de l'ATP.

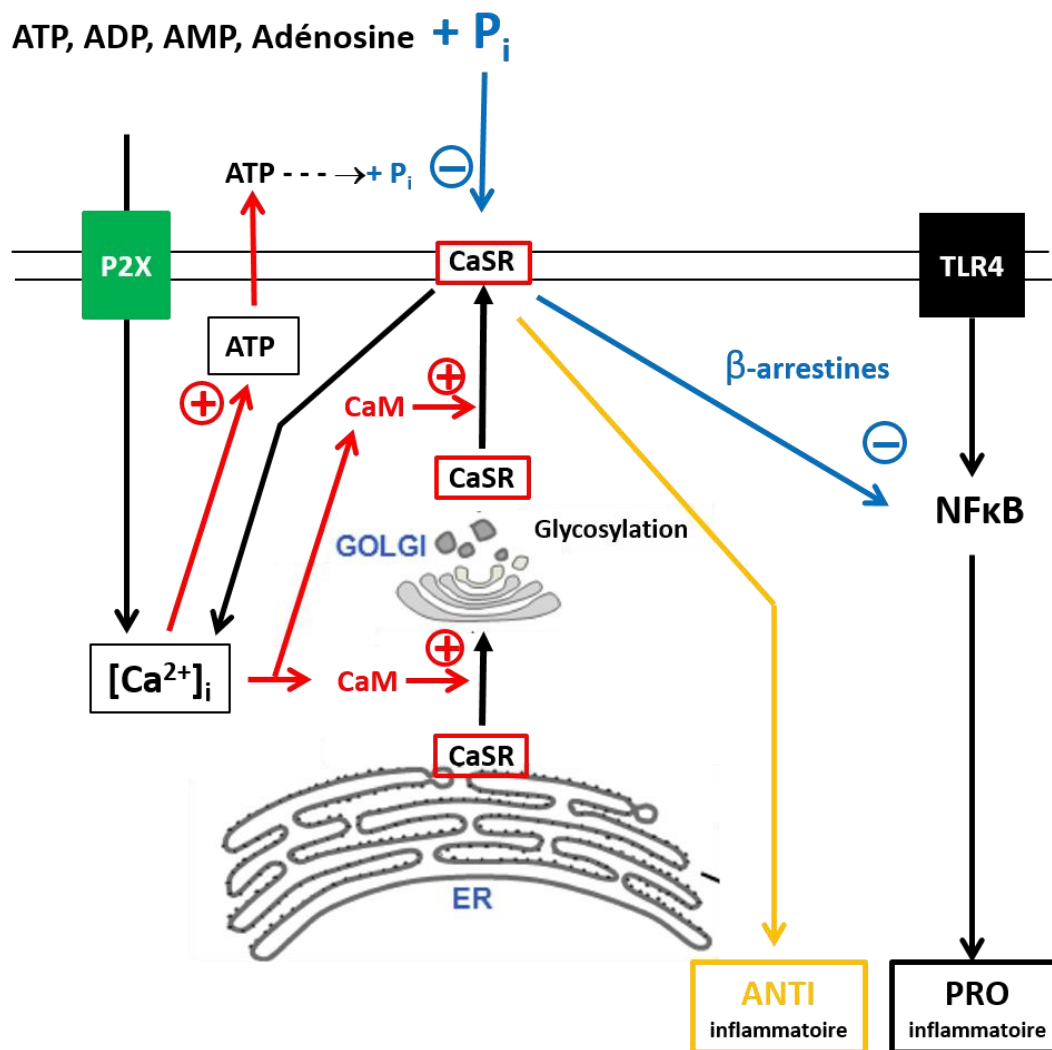
On peut supposer que dans le cas extrême d'une libération massive d'ATP, après lyses cellulaires par exemple, la concentration de Pi augmente fortement localement. Ceci va conduire à une forte inhibition du CaSR et de donc de la diminution de l'engagement de la voie  $G_{i/o}$  et conduire à une augmentation (ou à une diminution moins forte) d'AMPC.

La stimulation de TLR4 va à la fois transactiver le CaSR pour augmenter l'état anti-inflammatoire et en parallèle induire l'activation de voie NFκB qui va promouvoir un effet pro inflammatoire. Ces 2 voies vont avoir des effets opposés et l'effet global va dépendre du degré d'activation de TLR4 (anti-inflammatoire à faible stimulation, pro-inflammatoire à forte concentration (voir Figure 68)).

L'état pro-inflammatoire va se développer lorsque le système compensateur (anti-inflammatoire) impliquant le CaSR sera dépassé et que la balance penchera en faveur de la voie proinflammatoire

impliquant NFκB. A ce sujet, il faut noter que le principal frein sur la voie NFκB est constitué par les β arrestines recrutées par la stimulation du CaSR (Figure 71).

Par conséquent, on pourrait spéculer qu'une activation pharmacologique du CaSR pourrait représenter une option intéressante pour limiter le phénotype pro-inflammatoire. Une telle activation pourrait se faire avec des agonistes du CaSR ou des modulateurs allostériques de ce récepteur.



*Figure 71* : Schéma hypothétique des interactions indirectes entre la signalisation P2X, TLR-4 et le CaSR.

## VIII. Conclusions et perspectives

Nos expériences ont permis de caractériser la présence de plusieurs récepteurs P2Xs jusqu'à présent pas décrit dans les cellules microgliales (BV-2). Les récepteur P2X4 et P2X7 classiquement décrit dans les cellules microgliales, sont exprimés par nos cellules BV-2. L'utilisation d'agonistes et d'antagonistes spécifiques nous a permis de démontrer la présence de plusieurs autres récepteurs P2Xs, jusqu'à présent rarement décrit dans la microglie. Nos données permettent de conclure à la présence du récepteur P2X1, P2X3, P2X5 et P2X1/5 en plus des récepteur P2X4 et P2X7 communément décrits. Ces récepteurs permettent aux cellules microgliales BV-2 de détecter l'ATP sur une large palette de concentration, allant des concentrations nanomolaires aux concentrations micromolaires élevées ( $> 100\mu\text{M}$ ). Nos données permettent également de supposer des interactions fonctionnelles entre ces différents récepteurs, permettant ainsi de « filtrer » avec précision l'information provenant du milieu environnant.

De plus, les cellules microgliales BV-2 expriment également le récepteur sensible au calcium extracellulaire. Ce récepteur semble intervenir dans les changements phénotypiques des cellules microgliales BV-2. Nos résultats montrent que le CaSR est un acteur endogène important pour limiter la neuroinflammation et ouvrent de nombreuses questions et perspectives, dont nous allons résumer brièvement les principales dans les paragraphes ci-dessous.

1) Nous avons suggéré que l'activation des récepteurs P2X pouvait contrôler indirectement l'insertion membranaire et l'activité du CaSR par l'intermédiaire de l'activation de la voie calmoduline/calmoduline kinase. Ce point devra être vérifié expérimentalement en étudiant les effets de l'activation de différents sous-types de récepteurs P2X exprimés par les cellules BV-2 sur les réponses du CaSR (et vice versa) dans les cellules BV-2 en conditions « contrôle » traitées au « LPS » ou à « l'IL-4 ».

2) S'il existe une interaction fonctionnelle entre les récepteurs P2Xs et CaSR via le calcium libre intracellulaire, il serait important de localiser au niveau cellulaire et à haute résolution la proximité spatiale entre les récepteurs P2Xs et le CaSR. Ceci pourrait se faire en microscopie à haute résolution (microscopie bi photonique) suite à des marquages immunocytochimiques. Ces derniers permettraient également de localiser l'expression des récepteurs P2X et CaSR dans le corps cellulaire versus les prolongements dans les cellules quiescentes. La colocalisation de ces récepteurs au sein de radeaux lipidiques serait également intéressante à étudier.

3) Nous avons exclusivement étudié les variations de calcium libre intracellulaires. Or, le CaSR comme certains récepteurs P2Y (P2Y12 et P2Y13) peuvent également moduler les concentrations intracellulaires d'AMPc. Il serait donc intéressant d'évaluer les variations d'AMPc dans des cellules BV-2 suite à la stimulation du CaSR ou des récepteurs P2Y12 et P2Y13 en utilisant des sondes fluorescentes génétiquement encodées permettant de quantifier les niveaux d'AMPc intracellulaires (Bonnot et al., 2014). Nous avons notamment évoqué la possibilité d'un couplage du CaSR à la voie Rho via l'activation de  $G_{12/13}$ . Cette question pourrait également être étudiée avec cette approche d'imagerie de l'AMPc intracellulaire en combinaison avec une inhibition de la voie  $G_{12/13}$  par des ARN interférents par exemple.



## IX. Bibliographies

- Abbracchio, M. P., Burnstock, G., Verkhratsky, A., & Zimmermann, H. (2009). Purinergic signalling in the nervous system: an overview. *Trends in neurosciences*, 32(1), 19–29. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2008.10.001>
- Abd-El-Basset, E., & Fedoroff, S. (1995). Effect of bacterial wall lipopolysaccharide (LPS) on morphology, motility, and cytoskeletal organization of microglia in cultures. *Journal of Neuroscience Research*, 41(2), 222-237. <https://doi.org/10.1002/jnr.490410210>
- Abdelrahman, A., Namasivayam, V., Hinz, S., Schiedel, A. C., Köse, M., Burton, M., El-Tayeb, A., Gillard, M., Bajorath, J., de Ryck, M., & Müller, C. E. (2017). Characterization of P2X4 receptor agonists and antagonists by calcium influx and radioligand binding studies. *Biochemical Pharmacology*, 125, 41-54. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2016.11.016>
- Abe, M., Watanabe, K., Kuroda, Y., Nakagawa, T., & Higashi, H. (2018). Homodimer formation by the ATP/UTP receptor P2Y2 via disulfide bridges. *The Journal of Biochemistry*, 163(6), 475-480. <https://doi.org/10.1093/jb/mvy010>
- Adams, K. L., & Gallo, V. (2018). The diversity and disparity of the glial scar. *Nature Neuroscience*, 21(1), 9-15. <https://doi.org/10.1038/s41593-017-0033-9>
- Andrejew, R., Oliveira-Giacomelli, Á., Ribeiro, D. E., Glaser, T., Arnaud-Sampaio, V. F., Lameu, C., & Ulrich, H. (2020). The P2X7 Receptor : Central Hub of Brain Diseases. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 13, 124. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2020.00124>
- Antonio, L. S., Stewart, A. P., Varanda, W. A., & Edwardson, J. M. (2014). Identification of P2X2/P2X4/P2X6 heterotrimeric receptors using atomic force microscopy (AFM) imaging. *FEBS Letters*, 588(12), 2125-2128. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2014.04.048>
- Armato, U., Chiarini, A., Chakravarthy, B., Chioffi, F., Pacchiana, R., Colarusso, E., Whitfield, J. F., & Dal Prà, I. (2013). Calcium-sensing receptor antagonist (calcilytic) NPS 2143 specifically blocks the increased secretion of endogenous A $\beta$ 42 prompted by exogenous fibrillary or soluble A $\beta$ 25–35 in human cortical astrocytes and neurons—Therapeutic relevance to Alzheimer’s disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1832(10), 1634-1652. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2013.04.020>
- Arnoux, I., & Audinat, E. (2015). Fractalkine Signaling and Microglia Functions in the Developing Brain. *Neural plasticity*, 2015, 689404. <https://doi.org/10.1155/2015/689404>
- Audinat, E., & Arnoux, I. (2014). La microglie : des cellules immunitaires qui sculptent et contrôlent les synapses neuronales [Microglia: immune cells sculpting and controlling neuronal synapses]. *Medecine sciences : M/S*, 30(2), 153–159. <https://doi.org/10.1051/medsci/20143002012>
- Bahney, J., & von Bartheld, C. S. (2018). The Cellular Composition and Glia-Neuron Ratio in the Spinal Cord of a Human and a Nonhuman Primate : Comparison With Other Species and Brain Regions: NUMBER OF CELLS IN SPINAL CORD. *The Anatomical Record*, 301(4), 697-710. <https://doi.org/10.1002/ar.23728>
- Ballerini, P., Di Iorio, P., Ciccarelli, R., Nargi, E., D’Alimonte, I., Traversa, U., Rathbone, M. P., & Caciagli, F. (2002). Glial cells express multiple ATP binding cassette proteins which are involved in ATP release: *NeuroReport*, 13(14), 1789-1792. <https://doi.org/10.1097/00001756-200210070-00019>

- Ballesteros-Yáñez, I., Castillo, C. A., Merighi, S., & Gessi, S. (2018). The Role of Adenosine Receptors in Psychostimulant Addiction. *Frontiers in Pharmacology*, *8*, 985. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00985>
- Ballini, E., Virginio, C., Medhurst, S., Summerfield, S., Aldegheri, L., Buson, A., Carignani, C., Chen, Y., Giacometti, A., Lago, I., Powell, A., & Jarolimek, W. (2011). Characterization of three diaminopyrimidines as potent and selective antagonists of P2X3 and P2X2/3 receptors with *in vivo* efficacy in a pain model: Diaminopyrimidines *in vitro* and *in vivo* profile. *British Journal of Pharmacology*, *163*(6), 1315-1325. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01322.x>
- Bandyopadhyay, S., Tfelt-Hansen, J., & Chattopadhyay, N. (2010). Diverse roles of extracellular calcium-sensing receptor in the central nervous system. *Journal of Neuroscience Research*, *88*(10), 2073-2082. <https://doi.org/10.1002/jnr.22391>
- Bennett, M. L., Bennett, F. C., Liddelow, S. A., Ajami, B., Zamanian, J. L., Fernhoff, N. B., Mulinyawe, S. B., Bohlen, C. J., Adil, A., Tucker, A., Weissman, I. L., Chang, E. F., Li, G., Grant, G. A., Hayden Gephart, M. G., & Barres, B. A. (2016). New tools for studying microglia in the mouse and human CNS. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *113*(12), E1738–E1746. <https://doi.org/10.1073/pnas.1525528113>
- Bernier, L. P., Bohlen, C. J., York, E. M., Choi, H. B., Kamyabi, A., Dissing-Olesen, L., Hefendehl, J. K., Collins, H. Y., Stevens, B., Barres, B. A., & MacVicar, B. A. (2019). Nanoscale Surveillance of the Brain by Microglia via cAMP-Regulated Filopodia. *Cell reports*, *27*(10), 2895–2908.e4. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.05.010>
- Bernier, L.-P., Ase, A. R., Boué-Grabot, É., & Séguéla, P. (2012). P2X4 receptor channels form large noncytolytic pores in resting and activated microglia. *Glia*, *60*(5), 728-737. <https://doi.org/10.1002/glia.22301>
- Berridge, M. J. (2010). Calcium hypothesis of Alzheimer's disease. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, *459*(3), 441-449. <https://doi.org/10.1007/s00424-009-0736-1>
- Bertin, E., Deluc, T., Pilch, K. S., Martinez, A., Pougnet, J. T., Doudnikoff, E., Allain, A. E., Bergmann, P., Russeau, M., Toulmé, E., Bezard, E., Koch-Nolte, F., Séguéla, P., Lévi, S., Bontempi, B., Georges, F., Bertrand, S. S., Nicole, O., & Boué-Grabot, E. (2021). Increased surface P2X4 receptor regulates anxiety and memory in P2X4 internalization-defective knock-in mice. *Molecular psychiatry*, *26*(2), 629–644. <https://doi.org/10.1038/s41380-019-0641-8>
- Bertin, E., Martinez, A., Fayoux, A., Carvalho, K., Carracedo, S., Fernagut, P. O., Koch-Nolte, F., Blum, D., Bertrand, S. S., & Boué-Grabot, E. (2022). Increased surface P2X4 receptors by mutant SOD1 proteins contribute to ALS pathogenesis in SOD1-G93A mice. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, *79*(8), 431. <https://doi.org/10.1007/s00018-022-04461-5>
- Beurel, E., Grieco, S. F., & Jope, R. S. (2015). Glycogen synthase kinase-3 (GSK3) : Regulation, actions, and diseases. *Pharmacology & Therapeutics*, *148*, 114-131. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2014.11.016>
- Bianco, F., Fumagalli, M., Pravettoni, E., D'Ambrosi, N., Volonte, C., Matteoli, M., Abbracchio, M. P., & Verderio, C. (2005). Pathophysiological roles of extracellular nucleotides in glial cells: differential expression of purinergic receptors in resting and activated microglia. *Brain research. Brain research reviews*, *48*(2), 144–156. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2004.12.004>
- Bjelobaba, I., Janjic, M. M., & Stojilkovic, S. S. (2015). Purinergic signaling pathways in endocrine system. *Autonomic Neuroscience*, *191*, 102-116. <https://doi.org/10.1016/j.autneu.2015.04.010>

- Blasi, E., Barluzzi, R., Bocchini, V., Mazzolla, R., & Bistoni, F. (1990). Immortalization of murine microglial cells by a v-raf / v-myc carrying retrovirus. *Journal of Neuroimmunology*, 27(2-3), 229-237. [https://doi.org/10.1016/0165-5728\(90\)90073-V](https://doi.org/10.1016/0165-5728(90)90073-V)
- Bo, X., Jiang, L.-H., Wilson, H. L., Kim, M., Burnstock, G., Surprenant, A., & North, R. A. (2003). Pharmacological and Biophysical Properties of the Human P2X<sub>5</sub> Receptor. *Molecular Pharmacology*, 63(6), 1407-1416. <https://doi.org/10.1124/mol.63.6.1407>
- Boche, D., Perry, V. H., & Nicoll, J. A. (2013). Review: activation patterns of microglia and their identification in the human brain. *Neuropathology and applied neurobiology*, 39(1), 3–18. <https://doi.org/10.1111/nan.12011>
- Bonnot, A., Guiot, E., Hepp, R., Cavellini, L., Tricoire, L., & Lambolez, B. (2014). Single-fluorophore biosensors based on conformation-sensitive GFP variants. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 28(3), 1375–1385. <https://doi.org/10.1096/fj.13-240507>
- Borea, P. A., Gessi, S., Merighi, S., Vincenzi, F., & Varani, K. (2018). Pharmacology of Adenosine Receptors: The State of the Art. *Physiological Reviews*, 98(3), 1591-1625. <https://doi.org/10.1152/physrev.00049.2017>
- Boudot, C., Saidak, Z., Boulanouar, A. K., Petit, L., Gouilleux, F., Massy, Z., Brazier, M., Mentaverri, R., & Kamel, S. (2010). Implication of the calcium sensing receptor and the Phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway in the extracellular calcium-mediated migration of RAW 264.7 osteoclast precursor cells. *Bone*, 46(5), 1416–1423. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2010.01.383>
- Bouschet, T., Martin, S., Kanamarlapudi, V., Mundell, S., & Henley, J. M. (2007). The calcium-sensing receptor changes cell shape via a  $\beta$ -arrestin-1–ARNO–ARF6–ELMO protein network. *Journal of Cell Science*, 120(15), 2489-2497. <https://doi.org/10.1242/jcs.03469>
- Boya, J., Calvo, J., & Prado, A. (1979). *The origin of microglial cells*.
- Brake, A. J., Wagenbach, M. J., & Julius, D. (1994). New structural motif for ligand-gated ion channels defined by an ionotropic ATP receptor. *Nature*, 371(6497), 519-523. <https://doi.org/10.1038/371519a0>
- Brambilla, R., Bracchi-Ricard, V., Hu, W.-H., Frydel, B., Bramwell, A., Karmally, S., Green, E. J., & Bethea, J. R. (2005). Inhibition of astroglial nuclear factor  $\kappa$ B reduces inflammation and improves functional recovery after spinal cord injury. *Journal of Experimental Medicine*, 202(1), 145-156. <https://doi.org/10.1084/jem.20041918>
- Brautigam, V. M., Frasier, C., Nikodemova, M., & Watters, J. J. (2005). Purinergic receptor modulation of BV-2 microglial cell activity: potential involvement of p38 MAP kinase and CREB. *Journal of neuroimmunology*, 166(1-2), 113–125. <https://doi.org/10.1016/j.ineuroim.2005.05.012>
- Brawek, B., & Garaschuk, O. (2013). Microglial calcium signaling in the adult, aged and diseased brain. *Cell calcium*, 53(3), 159–169. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2012.12.003>
- Brazil, D. P., Yang, Z.-Z., & Hemmings, B. A. (2004). Advances in protein kinase B signalling : AKTion on multiple fronts. *Trends in Biochemical Sciences*, 29(5), 233-242. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2004.03.006>
- Breitwieser G. E. (2013). The calcium sensing receptor life cycle: trafficking, cell surface expression, and degradation. *Best practice & research. Clinical endocrinology & metabolism*, 27(3), 303–313. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2013.03.003>
- Brown, E. M., Gamba, G., Riccardi, D., Lombardi, M., Butters, R., Kifor, O., Sun, A., Hediger, M. A., Lytton, J., & Hebert, S. C. (1993). Cloning and characterization of an extracellular Ca(2+)-sensing

- receptor from bovine parathyroid. *Nature*, 366(6455), 575–580. <https://doi.org/10.1038/366575a0>
- Brown, G. C., & Neher, J. J. (2014). Microglial phagocytosis of live neurons. *Nature Reviews Neuroscience*, 15(4), 209–216. <https://doi.org/10.1038/nrn3710>
- Burnstock, G. (2008). Purinergic signalling and disorders of the central nervous system. *Nature Reviews Drug Discovery*, 7(7), 575–590. <https://doi.org/10.1038/nrd2605>
- Burnstock, G. (2012). Discovery of purinergic signalling, the initial resistance and current explosion of interest : Discovery of purinergic signalling. *British Journal of Pharmacology*, 167(2), 238–255. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2012.02008.x>
- Burnstock, G. (2013). Purinergic mechanisms and pain—An update. *European Journal of Pharmacology*, 716(1-3), 24–40. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2013.01.078>
- Burnstock, G. (2017). Purinergic Signalling : Therapeutic Developments. *Frontiers in Pharmacology*, 8, 661. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00661>
- Burnstock, G. (2018). Purine and purinergic receptors. *Brain and Neuroscience Advances*, 2, 239821281881749. <https://doi.org/10.1177/2398212818817494>
- Calovi, S., Mut-Arbona, P., & Sperlágh, B. (2019). Microglia and the Purinergic Signaling System. *Neuroscience*, 405, 137–147. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2018.12.021>
- Camandola, S. (2018). Astrocytes, emerging stars of energy homeostasis. *Cell Stress*, 2(10), 246–252. <https://doi.org/10.15698/cst2018.10.157>
- Campion, K. L., McCormick, W. D., Warwicker, J., Khayat, M. E. B., Atkinson-Dell, R., Steward, M. C., Delbridge, L. W., Mun, H.-C., Conigrave, A. D., & Ward, D. T. (2015). Pathophysiologic Changes in Extracellular pH Modulate Parathyroid Calcium-Sensing Receptor Activity and Secretion via a Histidine-Independent Mechanism. *Journal of the American Society of Nephrology*, 26(9), 2163–2171. <https://doi.org/10.1681/ASN.2014070653>
- Canton, J., Schlam, D., Breuer, C., Gütschow, M., Glogauer, M., & Grinstein, S. (2016). Calcium-sensing receptors signal constitutive macropinocytosis and facilitate the uptake of NOD2 ligands in macrophages. *Nature Communications*, 7(1), 11284. <https://doi.org/10.1038/ncomms11284>
- Carson, M. J., Doose, J. M., Melchior, B., Schmid, C. D., & Ploix, C. C. (2006). CNS immune privilege : Hiding in plain sight. *Immunological Reviews*, 213(1), 48–65. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2006.00441.x>
- Casalà, C., Gil-Guiñón, E., Ordóñez, J. L., Miguel-Queralt, S., Rodríguez, E., Galván, P., Lavarino, C., Munell, F., de Alava, E., Mora, J., & de Torres, C. (2013). The calcium-sensing receptor is silenced by genetic and epigenetic mechanisms in unfavorable neuroblastomas and its reactivation induces ERK1/2-dependent apoptosis. *Carcinogenesis*, 34(2), 268–276. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgs338>
- Cengiz, P., Zafer, D., Chandrashekar, J. H., Chanana, V., Bogost, J., Waldman, A., Novak, B., Kintner, D. B., & Ferrazzano, P. A. (2019). Developmental differences in microglia morphology and gene expression during normal brain development and in response to hypoxia-ischemia. *Neurochemistry international*, 127, 137–147. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2018.12.016>
- Centeno, P. P., Herberger, A., Mun, H. C., Tu, C., Nemeth, E. F., Chang, W., Conigrave, A. D., & Ward, D. T. (2019). Phosphate acts directly on the calcium-sensing receptor to stimulate parathyroid hormone secretion. *Nature communications*, 10(1), 4693. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12399-9>

- Chang, F., Kim, J. M., Choi, Y., & Park, K. (2018). MTA promotes chemotaxis and chemokinesis of immune cells through distinct calcium-sensing receptor signaling pathways. *Biomaterials*, *150*, 14-24. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.10.009>
- Chang, R. C. C., Hudson, P. M., Wilson, B. C., Liu, B., Abel, H., & Hong, J. S. (2000). High concentrations of extracellular potassium enhance bacterial endotoxin lipopolysaccharide-induced neurotoxicity in glia–neuron mixed cultures. *Neuroscience*, *97*(4), 757-764. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(00\)00059-2](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(00)00059-2)
- Chang, W., & Shoback, D. (2004). Extracellular Ca<sup>2+</sup>-sensing receptors—An overview. *Cell Calcium*, *35*(3), 183-196. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2003.10.012>
- Chang, W., Tu, C., Cheng, Z., Rodriguez, L., Chen, T.-H., Gassmann, M., Bettler, B., Margeta, M., Jan, L. Y., & Shoback, D. (2007). Complex Formation with the Type B  $\gamma$ -Aminobutyric Acid Receptor Affects the Expression and Signal Transduction of the Extracellular Calcium-sensing Receptor. *Journal of Biological Chemistry*, *282*(34), 25030-25040. <https://doi.org/10.1074/jbc.M700924200>
- Chattopadhyay, N., Ye, C., Yamaguchi, T., Nakai, M., Kifor, O., Vassilev, P. M., Nishimura, R. N., & Brown, E. M. (1999). The extracellular calcium-sensing receptor is expressed in rat microglia and modulates an outward K<sup>+</sup> channel. *Journal of neurochemistry*, *72*(5), 1915–1922. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1999.0721915.x>
- Chavarría, A., & Cárdenas, G. (2013). Neuronal influence behind the central nervous system regulation of the immune cells. *Frontiers in Integrative Neuroscience*, *7*. <https://doi.org/10.3389/fnint.2013.00064>
- Chen, C. C., Akopian, A. N., Sivilotti, L., Colquhoun, D., Burnstock, G., & Wood, J. N. (1995). A P2X purinoceptor expressed by a subset of sensory neurons. *Nature*, *377*(6548), 428–431. <https://doi.org/10.1038/377428a0>
- Chen, X., Wang, L., Cui, Q., Ding, Z., Han, L., Kou, Y., Zhang, W., Wang, H., Jia, X., Dai, M., Shi, Z., Li, Y., Li, X., & Geng, Y. (2021). Structural insights into the activation of human calcium-sensing receptor. *eLife*, *10*, e68578. <https://doi.org/10.7554/eLife.68578>
- Chun, L., Zhang, W., & Liu, J. (2012). Structure and ligand recognition of class C GPCRs. *Acta Pharmacologica Sinica*, *33*(3), 312-323. <https://doi.org/10.1038/aps.2011.186>
- Ciesielska, A., Matyjek, M., & Kwiatkowska, K. (2021). TLR4 and CD14 trafficking and its influence on LPS-induced pro-inflammatory signaling. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *78*(4), 1233-1261. <https://doi.org/10.1007/s00018-020-03656-y>
- Cockayne, D. A., Dunn, P. M., Zhong, Y., Rong, W., Hamilton, S. G., Knight, G. E., Ruan, H.-Z., Ma, B., Yip, P., Nunn, P., McMahon, S. B., Burnstock, G., & Ford, A. P. D. W. (2005). P2X<sub>2</sub> knockout mice and P2X<sub>2</sub>/P2X<sub>3</sub> double knockout mice reveal a role for the P2X<sub>2</sub> receptor subunit in mediating multiple sensory effects of ATP : Sensory deficits in P2X knockout mice. *The Journal of Physiology*, *567*(2), 621-639. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2005.088435>
- Coddou, C., Sandoval, R., Hevia, M. J., & Stojilkovic, S. S. (2019). Characterization of the antagonist actions of 5-BDBD at the rat P2X<sub>4</sub> receptor. *Neuroscience letters*, *690*, 219–224. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2018.10.047>
- Colella, M., Gerbino, A., Hofer, A. M., & Curci, S. (2016). Recent advances in understanding the extracellular calcium-sensing receptor. *F1000Research*, *5*, 2535. <https://doi.org/10.12688/f1000research.8963.1>
- Collo, G., North, R., Kawashima, E., Merlo-Pich, E., Neidhart, S., Surprenant, A., & Buell, G. (1996). Cloning OF P2X<sub>5</sub> and P2X<sub>6</sub> receptors and the distribution and properties of an extended family of

- ATP-gated ion channels. *The Journal of Neuroscience*, 16(8), 2495-2507. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.16-08-02495.1996>
- Combrinck, M. I., Perry, V. H., & Cunningham, C. (2002). Peripheral infection evokes exaggerated sickness behaviour in pre-clinical murine prion disease. *Neuroscience*, 112(1), 7–11. [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(02\)00030-1](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(02)00030-1)
- Compan, V., Ulmann, L., Stelmashenko, O., Chemin, J., Chaumont, S., & Rassendren, F. (2012). P2X2 and P2X5 Subunits Define a New Heteromeric Receptor with P2X7-Like Properties. *The Journal of Neuroscience*, 32(12), 4284-4296. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6332-11.2012>
- Conigrave, A. D., & Ward, D. T. (2013). Calcium-sensing receptor (CaSR) : Pharmacological properties and signaling pathways. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 27(3), 315-331. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2013.05.010>
- Conigrave, A. D., Mun, H.-C., Delbridge, L., Quinn, S. J., Wilkinson, M., & Brown, E. M. (2004). L-Amino Acids Regulate Parathyroid Hormone Secretion. *Journal of Biological Chemistry*, 279(37), 38151-38159. <https://doi.org/10.1074/jbc.M406373200>
- Cook, S. P., & McCleskey, E. W. (2002). Cell damage excites nociceptors through release of cytosolic ATP. *Pain*, 95(1), 41-47. [https://doi.org/10.1016/S0304-3959\(01\)00372-4](https://doi.org/10.1016/S0304-3959(01)00372-4)
- Coull, J. A. M., Beggs, S., Boudreau, D., Boivin, D., Tsuda, M., Inoue, K., Gravel, C., Salter, M. W., & De Koninck, Y. (2005). BDNF from microglia causes the shift in neuronal anion gradient underlying neuropathic pain. *Nature*, 438(7070), 1017-1021. <https://doi.org/10.1038/nature04223>
- Crabbé, M., Van der Perren, A., Bollaerts, I., Kounelis, S., Baekelandt, V., Bormans, G., Casteels, C., Moons, L., & Van Laere, K. (2019). Increased P2X7 Receptor Binding Is Associated With Neuroinflammation in Acute but Not Chronic Rodent Models for Parkinson’s Disease. *Frontiers in Neuroscience*, 13, 799. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00799>
- Craigie, E., & Wildman, S. S. (2013). The relationship between P2X4 and P2X7 : A physiologically important interaction? *Frontiers in Physiology*.
- Cronk, J. C., & Kipnis, J. (2013). Microglia – the brain’s busy bees. *F1000Prime Reports*, 5. <https://doi.org/10.12703/P5-53>
- Cruciani, R. A., Dvorkin, B., Morris, S. A., Crain, S. M., & Makman, M. H. (1993). Direct coupling of opioid receptors to both stimulatory and inhibitory guanine nucleotide-binding proteins in F-11 neuroblastoma-sensory neuron hybrid cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(7), 3019–3023. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.7.3019>
- Cserép, C., Pósfai, B., & Dénes, Á. (2021). Shaping Neuronal Fate : Functional Heterogeneity of Direct Microglia-Neuron Interactions. *Neuron*, 109(2), 222-240. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2020.11.007>
- Cserép, C., Pósfai, B., Lénárt, N., Fekete, R., László, Z. I., Lele, Z., Orsolits, B., Molnár, G., Heindl, S., Schwarcz, A. D., Ujvári, K., Környei, Z., Tóth, K., Szabadits, E., Sperlágh, B., Baranyi, M., Csiba, L., Hortobágyi, T., Maglóczy, Z., ... Dénes, Á. (2020). Microglia monitor and protect neuronal function through specialized somatic purinergic junctions. *Science*, 367(6477), 528-537. <https://doi.org/10.1126/science.aax6752>
- Cserép, C., Schwarcz, A. D., Pósfai, B., László, Z. I., Kellermayer, A., Környei, Z., Kisfali, M., Nyerges, M., Lele, Z., Katona, I., & Ádám Dénes. (2022). Microglial control of neuronal development via somatic purinergic junctions. *Cell Reports*, 40(12), 111369. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.111369>
- Cunningham, C., Wilcockson, D. C., Campion, S., Lunnon, K., & Perry, V. H. (2005). Central and systemic endotoxin challenges exacerbate the local inflammatory response and increase neuronal death

- during chronic neurodegeneration. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 25(40), 9275–9284. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2614-05.2005>
- D'Espessailles, A., Mora, Y. A., Fuentes, C., & Cifuentes, M. (2018). Calcium-sensing receptor activates the NLRP3 inflammasome in LS14 preadipocytes mediated by ERK1/2 signaling. *Journal of Cellular Physiology*, 233(8), 6232–6240. <https://doi.org/10.1002/jcp.26490>
- Daaka, Y., Luttrell, L. M., & Lefkowitz, R. J. (1997). *Switching of the coupling of the  $\alpha_2$ -adrenergic receptor to different G proteins by protein kinase A*. 390.
- Davey, A. E., Leach, K., Valant, C., Conigrave, A. D., Sexton, P. M., & Christopoulos, A. (2012). Positive and Negative Allosteric Modulators Promote Biased Signaling at the Calcium-Sensing Receptor. *Endocrinology*, 153(3), 1232–1241. <https://doi.org/10.1210/en.2011-1426>
- Davies, S. L., Ozawa, A., McCormick, W. D., Dvorak, M. M., & Ward, D. T. (2007). Protein Kinase C-mediated Phosphorylation of the Calcium-sensing Receptor Is Stimulated by Receptor Activation and Attenuated by Calyculin-sensitive Phosphatase Activity. *Journal of Biological Chemistry*, 282(20), 15048–15056. <https://doi.org/10.1074/jbc.M607469200>
- De Roo, M., Boué-Grobot, E., & Schlichter, R. (2010). Selective potentiation of homomeric P2X2 ionotropic ATP receptors by a fast non-genomic action of progesterone. *Neuropharmacology*, 58(3), 569–577. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2009.12.002>
- de Torres, C., Beleta, H., Díaz, R., Toran, N., Rodríguez, E., Lavarino, C., García, I., Acosta, S., Suñol, M., & Mora, J. (2009). The calcium-sensing receptor and parathyroid hormone-related protein are expressed in differentiated, favorable neuroblastic tumors. *Cancer*, 115(12), 2792–2803. <https://doi.org/10.1002/cncr.24304>
- Der feinere Bau des Nervensystems im Lic.pdf.* (s. d.).
- D'Espessailles, A., Santillana, N., Sanhueza, S., Fuentes, C., & Cifuentes, M. (2020). Calcium sensing receptor activation in THP-1 macrophages triggers NLRP3 inflammasome and human preadipose cell inflammation. *Molecular and cellular endocrinology*, 501, 110654. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2019.110654>
- Di Virgilio, F., Dal Ben, D., Sarti, A. C., Giuliani, A. L., & Falzoni, S. (2017). The P2X7 Receptor in Infection and Inflammation. *Immunity*, 47(1), 15–31. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.06.020>
- Di Virgilio, F., Schmalzing, G., & Markwardt, F. (2018). The Elusive P2X7 Macropore. *Trends in Cell Biology*, 28(5), 392–404. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2018.01.005>
- Di Virgilio, F., Vultaggio-Poma, V., Falzoni, S., & Giuliani, A. L. (2023). Extracellular ATP : A powerful inflammatory mediator in the central nervous system. *Neuropharmacology*, 224, 109333. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2022.109333>
- Diez-Fraile, A., Lammens, T., Benoit, Y., & D'Herde, K. G. (2013). The calcium-sensing receptor as a regulator of cellular fate in normal and pathological conditions. *Current molecular medicine*, 13(2), 282–295. <https://doi.org/10.2174/156652413804810763>
- Donnelly-Roberts, D. L., & Jarvis, M. F. (2007). Discovery of P2X<sub>7</sub> receptor-selective antagonists offers new insights into P2X<sub>7</sub> receptor function and indicates a role in chronic pain states : P2X<sub>7</sub> receptor pharmacology and its therapeutic potential. *British Journal of Pharmacology*, 151(5), 571–579. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707265>
- Donnelly-Roberts, D. L., Namovic, M. T., Han, P., & Jarvis, M. F. (2009). Mammalian P2X7 receptor pharmacology: comparison of recombinant mouse, rat and human P2X7 receptors. *British journal of pharmacology*, 157(7), 1203–1214. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00233.x>

- Dubyak, G. R. (2007). Go It Alone No More—P2X7 Joins the Society of Heteromeric ATP-Gated Receptor Channels : Fig. 1. *Molecular Pharmacology*, 72(6), 1402-1405. <https://doi.org/10.1124/mol.107.042077>
- Dunning, K., Martz, A., Peralta, F. A., Cevoli, F., Boué-Grabot, E., Compan, V., Gautherat, F., Wolf, P., Chataigneau, T., & Grutter, T. (2021). P2X7 Receptors and TMEM16 Channels Are Functionally Coupled with Implications for Macropore Formation and Current Facilitation. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(12), 6542. <https://doi.org/10.3390/ijms22126542>
- Dunwiddie, T. V., Diao, L., & Proctor, W. R. (1997). Adenine nucleotides undergo rapid, quantitative conversion to adenosine in the extracellular space in rat hippocampus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 17(20), 7673–7682. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.17-20-07673.1997>
- Edwards, F. A., Gibb, A. J., & Colquhoun, D. (1992). ATP receptor-mediated synaptic currents in the central nervous system. *Nature*, 359(6391), 144-147. <https://doi.org/10.1038/359144a0>
- Eersapah, V., Hugel, S., & Schlichter, R. (2019). High-resolution detection of ATP release from single cultured mouse dorsal horn spinal cord glial cells and its modulation by noradrenaline. *Purinergic Signalling*, 15(3), 403-420. <https://doi.org/10.1007/s11302-019-09673-2>
- Egan, T. M., & Khakh, B. S. (2004). Contribution of Calcium Ions to P2X Channel Responses. *The Journal of Neuroscience*, 24(13), 3413-3420. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5429-03.2004>
- Ellis, A., & Bennett, D. L. (2013). Neuroinflammation and the generation of neuropathic pain. *British journal of anaesthesia*, 111(1), 26–37. <https://doi.org/10.1093/bja/aet128>
- Fabbretti, E. (2019). P2X3 receptors are transducers of sensory signals. *Brain Research Bulletin*, 151, 119-124. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2018.12.020>
- Fernández-Arjona, M. D. M., Grondona, J. M., Fernández-Llebrez, P., & López-Ávalos, M. D. (2019). Microglial Morphometric Parameters Correlate With the Expression Level of IL-1 $\beta$ , and Allow Identifying Different Activated Morphotypes. *Frontiers in cellular neuroscience*, 13, 472. <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00472>
- Fields, R. D., & Burnstock, G. (2006). Purinergic signalling in neuron-glia interactions. *Nature reviews. Neuroscience*, 7(6), 423–436. <https://doi.org/10.1038/nrn1928>
- Finger, T. E., Danilova, V., Barrows, J., Bartel, D. L., Vigers, A. J., Stone, L., Hellekant, G., & Kinnamon, S. C. (2005). ATP Signaling Is Crucial for Communication from Taste Buds to Gustatory Nerves. *Science*, 310(5753), 1495-1499. <https://doi.org/10.1126/science.1118435>
- Fischer, W., & Krügel, U. (2007). P2Y receptors: focus on structural, pharmacological and functional aspects in the brain. *Current medicinal chemistry*, 14(23), 2429–2455. <https://doi.org/10.2174/092986707782023695>
- Foster, T. C. (2007). Calcium homeostasis and modulation of synaptic plasticity in the aged brain. *Aging Cell*, 6(3), 319-325. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2007.00283.x>
- Fuxe, K., Ferré, S., Genedani, S., Franco, R., & Agnati, L. F. (2007). Adenosine receptor–dopamine receptor interactions in the basal ganglia and their relevance for brain function. *Physiology & Behavior*, 92(1-2), 210-217. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2007.05.034>
- Galea, I. (2021). The blood–brain barrier in systemic infection and inflammation. *Cellular & Molecular Immunology*, 18(11), 2489-2501. <https://doi.org/10.1038/s41423-021-00757-x>
- Galea, I., Bechmann, I., & Perry, V. H. (2007). What is immune privilege (not)? *Trends in Immunology*, 28(1), 12-18. <https://doi.org/10.1016/j.it.2006.11.004>



- Galloway, D. A., Phillips, A. E. M., Owen, D. R. J., & Moore, C. S. (2019). Phagocytosis in the Brain : Homeostasis and Disease. *Frontiers in Immunology*, 10, 790. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00790>
- Gama, L., Wilt, S. G., & Breitwieser, G. E. (2001). Heterodimerization of Calcium Sensing Receptors with Metabotropic Glutamate Receptors in Neurons. *Journal of Biological Chemistry*, 276(42), 39053-39059. <https://doi.org/10.1074/jbc.M105662200>
- Gebicke-Haerter, P. J., & Norgauer, J. (2001). *Microglial chemokines and chemokine receptors*.
- Geirsdottir, L., David, E., Keren-Shaul, H., Weiner, A., Bohlen, S. C., Neuber, J., Balic, A., Giladi, A., Sheban, F., Dutertre, C.-A., Pfeifle, C., Peri, F., Raffo-Romero, A., Vizioli, J., Matiassek, K., Scheiwe, C., Meckel, S., Mätz-Rensing, K., van der Meer, F., ... Prinz, M. (2019). Cross-Species Single-Cell Analysis Reveals Divergence of the Primate Microglia Program. *Cell*, 179(7), 1609-1622.e16. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.11.010>
- Gendron, F. P., Chalimoniuk, M., Strosznajder, J., Shen, S., González, F. A., Weisman, G. A., & Sun, G. Y. (2003). P2X7 nucleotide receptor activation enhances IFN gamma-induced type II nitric oxide synthase activity in BV-2 microglial cells. *Journal of neurochemistry*, 87(2), 344–352. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2003.01995.x>
- Geng, Y., Mosyak, L., Kurinov, I., Zuo, H., Sturchler, E., Cheng, T. C., Subramanyam, P., Brown, A. P., Brennan, S. C., Mun, H., Bush, M., Chen, Y., Nguyen, T. X., Cao, B., Chang, D. D., Quick, M., Conigrave, A. D., Colecraft, H. M., McDonald, P., & Fan, Q. R. (2016). Structural mechanism of ligand activation in human calcium-sensing receptor. *ELife*, 5, e13662. <https://doi.org/10.7554/eLife.13662>
- Ginhoux, F., & Prinz, M. (2015). Origin of Microglia : Current Concepts and Past Controversies. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(8), a020537. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a020537>
- Giuliani, A. L., Sarti, A. C., Falzoni, S., & Di Virgilio, F. (2017). The P2X7 Receptor-Interleukin-1 Liaison. *Frontiers in Pharmacology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00123>
- Gong, C.-X., Liu, F., & Iqbal, K. (2018). Multifactorial Hypothesis and Multi-Targets for Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 64(s1), S107-S117. <https://doi.org/10.3233/JAD-179921>
- Goolam, M. A., Brown, A. P., Edwards, K. T., Gregory, K. J., Leach, K., & Conigrave, A. D. (2022). Cell Surface Calcium-Sensing Receptor Heterodimers : Mutant Gene Dosage Affects Ca<sup>2+</sup> Sensing but Not G Protein Interaction. *Journal of Bone and Mineral Research*, 37(9), 1787-1807. <https://doi.org/10.1002/jbmr.4651>
- Grant, M. P., Stepanchick, A., Cavanaugh, A., & Breitwieser, G. E. (2011). Agonist-Driven Maturation and Plasma Membrane Insertion of Calcium-Sensing Receptors Dynamically Control Signal Amplitude. *Science Signaling*, 4(200). <https://doi.org/10.1126/scisignal.2002208>
- Grassivaro, F., Menon, R., Acquaviva, M., Ottoboni, L., Ruffini, F., Bergamaschi, A., Muzio, L., Farina, C., & Martino, G. (2020). Convergence between Microglia and Peripheral Macrophages Phenotype during Development and Neuroinflammation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 40(4), 784–795. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1523-19.2019>
- Green, K. N., & LaFerla, F. M. (2008). Linking Calcium to A $\beta$  and Alzheimer's Disease. *Neuron*, 59(2), 190-194. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.07.013>
- Guse, A. H., Gil Montoya, D. C., & Diercks, B.-P. (2021). Mechanisms and functions of calcium microdomains produced by ORAI channels, d-myo-inositol 1,4,5-trisphosphate receptors, or

- ryanodine receptors. *Pharmacology & Therapeutics*, 223, 107804. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2021.107804>
- Haines, W. R., Torres, G. E., Voigt, M. M., & Egan, T. M. (1999). Properties of the novel ATP-gated ionotropic receptor composed of the P2X(1) and P2X(5) isoforms. *Molecular pharmacology*, 56(4), 720–727.
- Haley, M. J., Brough, D., Quintin, J., & Allan, S. M. (2019). Microglial Priming as Trained Immunity in the Brain. *Neuroscience*, 405, 47-54. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2017.12.039>
- Handlogten, M. E., Shiraishi, N., Awata, H., Huang, C., & Miller, R. T. (2000). Extracellular Ca<sup>2+</sup>-sensing receptor is a promiscuous divalent cation sensor that responds to lead. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 279(6), F1083-F1091. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.2000.279.6.F1083>
- Hanisch, U. (2002). Microglia as a source and target of cytokines. *Glia*, 40(2), 140-155. <https://doi.org/10.1002/glia.10161>
- Hannan, F. M., Kallay, E., Chang, W., Brandi, M. L., & Thakker, R. V. (2019). The calcium-sensing receptor in physiology and in calcitropic and noncalcitropic diseases. *Nature Reviews Endocrinology*, 15(1), 33-51. <https://doi.org/10.1038/s41574-018-0115-0>
- Hardy, J., & Selkoe, D. J. (2002). The Amyloid Hypothesis of Alzheimer's Disease : Progress and Problems on the Road to Therapeutics. *Science*, 297(5580), 353-356. <https://doi.org/10.1126/science.1072994>
- Harhun, M. I., Povstyan, O. V., Albert, A. P., & Nichols, C. M. (2014). ATP-Evoked Sustained Vasoconstrictions Mediated by Heteromeric P2X1/4 Receptors in Cerebral Arteries. *Stroke*, 45(8), 2444-2450. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.114.005544>
- Hart, C. G., & Karimi-Abdolrezaee, S. (2021). Recent insights on astrocyte mechanisms in CNS homeostasis, pathology, and repair. *Journal of Neuroscience Research*, 99(10), 2427-2462. <https://doi.org/10.1002/jnr.24922>
- Hattori, M., & Gouaux, E. (2012). Molecular mechanism of ATP binding and ion channel activation in P2X receptors. *Nature*, 485(7397), 207–212. <https://doi.org/10.1038/nature11010>
- Haydon, P. G., & Carmignoto, G. (2006). Astrocyte control of synaptic transmission and neurovascular coupling. *Physiological reviews*, 86(3), 1009–1031. <https://doi.org/10.1152/physrev.00049.2005>
- Haynes, S. E., Hollopeter, G., Yang, G., Kurpius, D., Dailey, M. E., Gan, W.-B., & Julius, D. (2006). The P2Y12 receptor regulates microglial activation by extracellular nucleotides. *Nature Neuroscience*, 9(12), 1512-1519. <https://doi.org/10.1038/nn1805>
- He, Y., Taylor, N., Fourgeaud, L., & Bhattacharya, A. (2017). The role of microglial P2X7 : Modulation of cell death and cytokine release. *Journal of Neuroinflammation*, 14(1), 135. <https://doi.org/10.1186/s12974-017-0904-8>
- Hechler, B., Magnenat, S., Zighetti, M. L., Kassack, M. U., Ullmann, H., Cazenave, J. P., Evans, R., Cattaneo, M., & Gachet, C. (2005). Inhibition of platelet functions and thrombosis through selective or nonselective inhibition of the platelet P2 receptors with increasing doses of NF449 [4,4',4'',4'''-(carbonylbis(imino-5,1,3-benzenetriylbis-(carbonylimino)))tetrakis-benzene-1,3-disulfonic acid octasodium salt]. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 314(1), 232–243. <https://doi.org/10.1124/jpet.105.084673>
- Hendy, G. N., & Canaff, L. (2016). Calcium-Sensing Receptor Gene: Regulation of Expression. *Frontiers in physiology*, 7, 394. <https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00394>

- Henn, A. (2009). The suitability of BV2 cells as alternative model system for primary microglia cultures or for animal experiments examining brain inflammation. *ALTEX*, 83-94. <https://doi.org/10.14573/altex.2009.2.83>
- Herrera-Vigener, F., Hernández-García, R., Valadez-Sánchez, M., Vázquez-Prado, J., & Reyes-Cruz, G. (2006). AMSH regulates calcium-sensing receptor signaling through direct interactions. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 347(4), 924-930. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.06.169>
- Herx, L. M., & Yong, V. W. (2001). Interleukin-1 $\beta$  is Required for the Early Evolution of Reactive Astrogliosis Following CNS Lesion. *J Neuropathol Exp Neurol*, 60.
- Hjälml, G., MacLeod, R. J., Kifor, O., Chattopadhyay, N., & Brown, E. M. (2001). Filamin-A Binds to the Carboxyl-terminal Tail of the Calcium-sensing Receptor, an Interaction That Participates in CaR-mediated Activation of Mitogen-activated Protein Kinase. *Journal of Biological Chemistry*, 276(37), 34880-34887. <https://doi.org/10.1074/jbc.M100784200>
- Hobson, S. A., Wright, J., Lee, F., McNeil, S. E., Bilderback, T., & Rodland, K. D. (2003). Activation of the MAP kinase cascade by exogenous calcium-sensing receptor. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 200(1-2), 189-198. [https://doi.org/10.1016/S0303-7207\(01\)00749-3](https://doi.org/10.1016/S0303-7207(01)00749-3)
- Holton, P. (1959). The liberation of adenosine triphosphate on antidromic stimulation of sensory nerves. *The Journal of Physiology*, 145(3), 494-504. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1959.sp006157>
- Honda, S., Sasaki, Y., Ohsawa, K., Imai, Y., Nakamura, Y., Inoue, K., & Kohsaka, S. (2001). Extracellular ATP or ADP induce chemotaxis of cultured microglia through Gi/o-coupled P2Y receptors. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 21(6), 1975–1982. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-06-01975.2001>
- Honore, P., Donnelly-Roberts, D., Namovic, M. T., Hsieh, G., Zhu, C. Z., Mikusa, J. P., Hernandez, G., Zhong, C., Gauvin, D. M., Chandran, P., Harris, R., Medrano, A. P., Carroll, W., Marsh, K., Sullivan, J. P., Faltynek, C. R., & Jarvis, M. F. (2006). A-740003 [N-(1-[(cyanoimino)(5-quinolinylamino)methyl]amino)-2,2-dimethylpropyl)-2-(3,4-dimethoxyphenyl)acetamide], a novel and selective P2X7 receptor antagonist, dose-dependently reduces neuropathic pain in the rat. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 319(3), 1376–1385. <https://doi.org/10.1124/jpet.106.111559>
- Huang, Y., & Breitwieser, G. E. (2007). Rescue of calcium-sensing receptor mutants by allosteric modulators reveals a conformational checkpoint in receptor biogenesis. *The Journal of biological chemistry*, 282(13), 9517–9525. <https://doi.org/10.1074/jbc.M609045200>
- Hung, S.-C., Choi, C. H., Said-Sadier, N., Johnson, L., Atanasova, K. R., Sellami, H., Yilmaz, Ö., & Ojcius, D. M. (2013). P2X4 Assembles with P2X7 and Pannexin-1 in Gingival Epithelial Cells and Modulates ATP-induced Reactive Oxygen Species Production and Inflammasome Activation. *PLoS ONE*, 8(7), e70210. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070210>
- Iamartino, L., & Brandi, M. L. (2022). The calcium-sensing receptor in inflammation : Recent updates. *Frontiers in Physiology*, 13, 1059369. <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.1059369>
- Iglesias, R., Dahl, G., Qiu, F., Spray, D. C., & Scemes, E. (2009). Pannexin 1 : The Molecular Substrate of Astrocyte “Hemichannels”. *The Journal of Neuroscience*, 29(21), 7092-7097. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6062-08.2009>
- Ikeda, M. (2007). Characterization of functional P2X1 receptors in mouse megakaryocytes. *Thrombosis Research*, 119(3), 343-353. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2006.03.007>

- Illes, P., Khan, T. M., & Rubini, P. (2017). Neuronal P2X7 Receptors Revisited : Do They Really Exist? *The Journal of Neuroscience*, 37(30), 7049-7062. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3103-16.2017>
- Illes, P., Müller, C. E., Jacobson, K. A., Grutter, T., Nicke, A., Fountain, S. J., Kennedy, C., Schmalzing, G., Jarvis, M. F., Stojilkovic, S. S., King, B. F., & Di Virgilio, F. (2021). Update of P2X receptor properties and their pharmacology : IUPHAR Review 30. *British Journal of Pharmacology*, 178(3), 489-514. <https://doi.org/10.1111/bph.15299>
- Illes, P., Verkhatsky, A., & Tang, Y. (2020). Pathological ATPergic Signaling in Major Depression and Bipolar Disorder. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 12, 331. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2019.00331>
- Illes, P., Verkhatsky, A., Burnstock, G., & Franke, H. (2012). P2X Receptors and Their Roles in Astroglia in the Central and Peripheral Nervous System. *The Neuroscientist*, 18(5), 422-438. <https://doi.org/10.1177/1073858411418524>
- Imura, Y., Morizawa, Y., Komatsu, R., Shibata, K., Shinozaki, Y., Kasai, H., Moriishi, K., Moriyama, Y., & Koizumi, S. (2013). Microglia release ATP by exocytosis : Microglia Exocytose ATP. *Glia*, 61(8), 1320-1330. <https://doi.org/10.1002/glia.22517>
- Inoue, K., Koizumi, S., & Tsuda, M. (2007). The role of nucleotides in the neuron-glia communication responsible for the brain functions : Role of nucleotides in the neuron-glia communication. *Journal of Neurochemistry*, 102(5), 1447-1458. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.04824.x>
- Irino, Y., Nakamura, Y., Inoue, K., Kohsaka, S., & Ohsawa, K. (2008). Akt activation is involved in P2Y12 receptor-mediated chemotaxis of microglia. *Journal of neuroscience research*, 86(7), 1511–1519. <https://doi.org/10.1002/jnr.21610>
- Jeong, Y. H., Walsh, M. C., Yu, J., Shen, H., Wherry, E. J., & Choi, Y. (2020). Mice Lacking the Purinergic Receptor P2X5 Exhibit Defective Inflammasome Activation and Early Susceptibility to *Listeria monocytogenes*. *The Journal of Immunology*, 205(3), 760-766. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1901423>
- Jewett, K. A., & Krueger, J. M. (2012). Humoral Sleep Regulation; Interleukin-1 and Tumor Necrosis Factor. In *Vitamins & Hormones* (Vol. 89, p. 241-257). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394623-2.00013-5>
- Jo, Y.-H., & Schlichter, R. (1999). Synaptic corelease of ATP and GABA in cultured spinal neurons. *Nature Neuroscience*, 2(3), 241-245. <https://doi.org/10.1038/6344>
- Jones, C. A., Chessell, I. P., Simon, J., Barnard, E. A., Miller, K. J., Michel, A. D., & Humphrey, P. P. A. (2000). Functional characterization of the P2X<sub>4</sub> receptor orthologues : Mouse P2X<sub>4</sub> receptors. *British Journal of Pharmacology*, 129(2), 388-394. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0703059>
- Jones, C. A., Vial, C., Sellers, L. A., Humphrey, P. P. A., Evans, R. J., & Chessell, I. P. (2004). Functional Regulation of P2X<sub>6</sub> Receptors by N-Linked Glycosylation : Identification of a Novel αβ-Methylene ATP-Sensitive Phenotype. *Molecular Pharmacology*, 65(4), 979-985. <https://doi.org/10.1124/mol.65.4.979>
- Jooss, T., Zhang, J., Zimmer, B., Rezzonico-Jost, T., Rissiek, B., Felipe Pelczar, P., Seehusen, F., Koch-Nolte, F., Magnus, T., Zierler, S., Huber, S., Schemann, M., Grassi, F., & Nicke, A. (2023). Macrophages and glia are the dominant P2X7-expressing cell types in the gut nervous system—No evidence for the role of neuronal P2X7 receptors in colitis. *Mucosal Immunology*, 16(2), 180-193. <https://doi.org/10.1016/j.mucimm.2022.11.003>

- Jordão, M. J. C., Sankowski, R., Brendecke, S. M., Sagar, Locatelli, G., Tai, Y.-H., Tay, T. L., Schramm, E., Armbruster, S., Hagemeyer, N., Groß, O., Mai, D., Çiçek, Ö., Falk, T., Kerschensteiner, M., Grün, D., & Prinz, M. (2019). Single-cell profiling identifies myeloid cell subsets with distinct fates during neuroinflammation. *Science*, 363(6425), eaat7554. <https://doi.org/10.1126/science.aat7554>
- Jurga, A. M., Paleczna, M., & Kuter, K. Z. (2020). Overview of General and Discriminating Markers of Differential Microglia Phenotypes. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 14, 198. <https://doi.org/10.3389/fncel.2020.00198>
- Jurga, A. M., Paleczna, M., Kadluczka, J., & Kuter, K. Z. (2021). Beyond the GFAP-Astrocyte Protein Markers in the Brain. *Biomolecules*, 11(9), 1361. <https://doi.org/10.3390/biom11091361>
- Kaczmarek-Hajek, K., Zhang, J., Kopp, R., Grosche, A., Rissiek, B., Saul, A., Bruzzone, S., Engel, T., Jooss, T., Krautloher, A., Schuster, S., Magnus, T., Stadelmann, C., Sirko, S., Koch-Nolte, F., Eulenburg, V., & Nicke, A. (2018). Re-evaluation of neuronal P2X7 expression using novel mouse models and a P2X7-specific nanobody. *ELife*, 7, e36217. <https://doi.org/10.7554/eLife.36217>
- Kalogeris, T., Baines, C. P., Krenz, M., & Korthuis, R. J. (2012). Cell Biology of Ischemia/Reperfusion Injury. In *International Review of Cell and Molecular Biology* (Vol. 298, p. 229-317). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394309-5.00006-7>
- Kanellopoulos, J. M., Almeida-da-Silva, C. L. C., Rützel Boudinot, S., & Ojcius, D. M. (2021). Structural and Functional Features of the P2X4 Receptor: An Immunological Perspective. *Frontiers in Immunology*, 12, 645834. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.645834>
- Karasawa, A., & Kawate, T. (2016). Structural basis for subtype-specific inhibition of the P2X7 receptor. *ELife*, 5, e22153. <https://doi.org/10.7554/eLife.22153>
- Karasawa, A., Michalski, K., Mikhelzon, P., & Kawate, T. (2017). The P2X7 receptor forms a dye-permeable pore independent of its intracellular domain but dependent on membrane lipid composition. *ELife*, 6, e31186. <https://doi.org/10.7554/eLife.31186>
- Kawate, T., Michel, J. C., Birdsong, W. T., & Gouaux, E. (2009). Crystal structure of the ATP-gated P2X(4) ion channel in the closed state. *Nature*, 460(7255), 592–598. <https://doi.org/10.1038/nature08198>
- Kennedy, C. (2021). ATP as a cotransmitter in sympathetic and parasympathetic nerves—Another Burnstock legacy. *Autonomic Neuroscience*, 235, 102860. <https://doi.org/10.1016/j.autneu.2021.102860>
- Kifor, O., Diaz, R., Butters, R., Kifor, I., & Brown, E. M. (1998). The Calcium-sensing Receptor Is Localized in Caveolin-rich Plasma Membrane Domains of Bovine Parathyroid Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 273(34), 21708-21713. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.34.21708>
- Kifor, O., MacLeod, R. J., Diaz, R., Bai, M., Yamaguchi, T., Yao, T., Kifor, I., & Brown, E. M. (2001). Regulation of MAP kinase by calcium-sensing receptor in bovine parathyroid and CaR-transfected HEK293 cells. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 280(2), F291-F302. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.2001.280.2.F291>
- Kim, H., Kajikawa, T., Walsh, M. C., Takegahara, N., Jeong, Y. H., Hajishengallis, G., & Choi, Y. (2018). The purinergic receptor P2X5 contributes to bone loss in experimental periodontitis. *BMB Reports*, 51(9), 468-473. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2018.51.9.126>
- Kim, H., Walsh, M. C., Takegahara, N., Middleton, S. A., Shin, H.-I., Kim, J., & Choi, Y. (2017). The purinergic receptor P2X5 regulates inflammasome activity and hyper-multinucleation of murine osteoclasts. *Scientific Reports*, 7(1), 196. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-00139-2>

- King, B. F. (2022). Rehabilitation of the P2X5 receptor : A re-evaluation of structure and function. *Purinergic Signalling*. <https://doi.org/10.1007/s11302-022-09903-0>
- King, B. F., Townsend-Nicholson, A., Wildman, S. S., Thomas, T., Spyer, K. M., & Burnstock, G. (2000). Coexpression of Rat P2X<sub>2</sub> and P2X<sub>6</sub> Subunits in *Xenopus* Oocytes. *The Journal of Neuroscience*, 20(13), 4871-4877. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.20-13-04871.2000>
- Konishi, H., Kiyama, H., & Ueno, M. (2019). Dual functions of microglia in the formation and refinement of neural circuits during development. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 77(1), 18-25. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2018.09.009>
- Konishi, H., Okamoto, T., Hara, Y., Komine, O., Tamada, H., Maeda, M., Osako, F., Kobayashi, M., Nishiyama, A., Kataoka, Y., Takai, T., Udagawa, N., Jung, S., Ozato, K., Tamura, T., Tsuda, M., Yamanaka, K., Ogi, T., Sato, K., & Kiyama, H. (2020). Astrocytic phagocytosis is a compensatory mechanism for microglial dysfunction. *The EMBO Journal*, 39(22). <https://doi.org/10.15252/emboj.2020104464>
- Kozasa, T., Hajicek, N., Chow, C. R., & Suzuki, N. (2011). Signalling mechanisms of RhoGTPase regulation by the heterotrimeric G proteins G12 and G13. *Journal of Biochemistry*, 150(4), 357-369. <https://doi.org/10.1093/jb/mvr105>
- Kuhn, S., Gritti, L., Crooks, D., & Dombrowski, Y. (2019). Oligodendrocytes in Development, Myelin Generation and Beyond. *Cells*, 8(11), 1424. <https://doi.org/10.3390/cells8111424>
- Kwon, H. S., & Koh, S. H. (2020). Neuroinflammation in neurodegenerative disorders: the roles of microglia and astrocytes. *Translational neurodegeneration*, 9(1), 42. <https://doi.org/10.1186/s40035-020-00221-2>
- Lalo, U., Pankratov, Y., Wichert, S. P., Rossner, M. J., North, R. A., Kirchhoff, F., & Verkhratsky, A. (2008). P2X<sub>1</sub> and P2X<sub>5</sub> Subunits Form the Functional P2X Receptor in Mouse Cortical Astrocytes. *The Journal of Neuroscience*, 28(21), 5473-5480. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1149-08.2008>
- Lamers, C., Plüss, C. J., & Ricklin, D. (2021). The Promiscuous Profile of Complement Receptor 3 in Ligand Binding, Immune Modulation, and Pathophysiology. *Frontiers in Immunology*, 12, 662164. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.662164>
- Langen, P., & Hucho, F. (2008). Karl Lohmann and the discovery of ATP. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, 47(10), 1824–1827. <https://doi.org/10.1002/anie.200702929>
- Lawler, O. A., Miggin, S. M., & Kinsella, B. T. (2001). Protein kinase A-mediated phosphorylation of serine 357 of the mouse prostacyclin receptor regulates its coupling to G(s)-, to G(i)-, and to G(q)-coupled effector signaling. *The Journal of biological chemistry*, 276(36), 33596–33607. <https://doi.org/10.1074/jbc.M104434200>
- Lawson, L. J., Perry, V. H., Dri, P., & Gordon, S. (1990). Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience*, 39(1), 151–170. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(90\)90229-w](https://doi.org/10.1016/0306-4522(90)90229-w)
- Lê, K.-T., Babinski, K., & Séguéla, P. (1998). Central P2X<sub>4</sub> and P2X<sub>6</sub> Channel Subunits Coassemble into a Novel Heteromeric ATP Receptor. *The Journal of Neuroscience*, 18(18), 7152-7159. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.18-18-07152.1998>
- Lebedeva, T., Dustin, M. L., & Sykulev, Y. (2005). ICAM-1 co-stimulates target cells to facilitate antigen presentation. *Current opinion in immunology*, 17(3), 251–258. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2005.04.008>
- Lecut, C., Faccinetto, C., Delierneux, C., van Oerle, R., Spronk, H. M., Evans, R. J., El Benna, J., Bours, V., & Oury, C. (2012). ATP-gated P2X1 ion channels protect against endotoxemia by dampening

- neutrophil activation. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*, 10(3), 453–465. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2011.04606.x>
- Lee, C. M., & Reddy, E. P. (1999). The v-myc oncogene. *Oncogene*, 18(19), 2997–3003. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1202786>
- Lee, G.-S., Subramanian, N., Kim, A. I., Aksentijevich, I., Goldbach-Mansky, R., Sacks, D. B., Germain, R. N., Kastner, D. L., & Chae, J. J. (2012). The calcium-sensing receptor regulates the NLRP3 inflammasome through Ca<sup>2+</sup> and cAMP. *Nature*, 492(7427), 123-127. <https://doi.org/10.1038/nature11588>
- Lembrechts, R., Brouns, I., Schnorbusch, K., Pintelon, I., Kemp, P. J., Timmermans, J. P., Riccardi, D., & Adriaensen, D. (2013). Functional expression of the multimodal extracellular calcium-sensing receptor in pulmonary neuroendocrine cells. *Journal of cell science*, 126(Pt 19), 4490–4501. <https://doi.org/10.1242/jcs.131656>
- Lemke, G. (2013). Biology of the TAM Receptors. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(11), a009076-a009076. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a009076>
- Lenhossék, M. (1893). *Der feinere Bau des Nervensystems im Lichte neuester Forschungen*. Fischer
- Li, B., Hou, L., Song, C., Wang, Z., Xue, Q., Li, Y., Qin, J., Cao, N., Jia, C., Zhang, Y., & Shi, W. (2022). Biological function of calcium-sensing receptor (CAS) and its coupling calcium signaling in plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 180, 74-80. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2022.03.032>
- Li, M., Toombes, G. E. S., Silberberg, S. D., & Swartz, K. J. (2015). Physical basis of apparent pore dilation of ATP-activated P2X receptor channels. *Nature Neuroscience*, 18(11), 1577-1583. <https://doi.org/10.1038/nn.4120>
- Li, M., Wang, Y., Banerjee, R., Marinelli, F., Silberberg, S., Faraldo-Gómez, J. D., Hattori, M., & Swartz, K. J. (2019). Molecular mechanisms of human P2X<sub>3</sub> receptor channel activation and modulation by divalent cation bound ATP. *ELife*, 8, e47060. <https://doi.org/10.7554/eLife.47060>
- Li, S., Fang, Y., Zhang, Y., Song, M., Zhang, X., Ding, X., Yao, H., Chen, M., Sun, Y., Ding, J., Wang, Q., Lu, M., Wu, G., & Hu, G. (2022). Microglial NLRP3 inflammasome activates neurotoxic astrocytes in depression-like mice. *Cell Reports*, 41(4), 111532. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.111532>
- Lier, J., Streit, W. J., & Bechmann, I. (2021). Beyond Activation : Characterizing Microglial Functional Phenotypes. *Cells*, 10(9), 2236. <https://doi.org/10.3390/cells10092236>
- Light, A. R., Wu, Y., Hughen, R. W., & Guthrie, P. B. (2006). Purinergic receptors activating rapid intracellular Ca increases in microglia. *Neuron glia biology*, 2(2), 125–138. <https://doi.org/10.1017/S1740925X05000323>
- Lim W. K. (2007). GPCR drug discovery: novel ligands for CNS receptors. *Recent patents on CNS drug discovery*, 2(2), 107–112. <https://doi.org/10.2174/157488907780832689>
- Lin, S.-S., Tang, Y., Illes, P., & Verkhatsky, A. (2021). The Safeguarding Microglia : Central Role for P2Y<sub>12</sub> Receptors. *Frontiers in Pharmacology*, 11, 627760. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.627760>
- Ling, S., Shi, P., Liu, S., Meng, X., Zhou, Y., Sun, W., Chang, S., Zhang, X., Zhang, L., Shi, C., Sun, D., Liu, L., & Tian, C. (2021). Structural mechanism of cooperative activation of the human calcium-sensing receptor by Ca<sup>2+</sup> ions and L-tryptophan. *Cell Research*, 31(4), 383-394. <https://doi.org/10.1038/s41422-021-00474-0>
- Linnerbauer, M., Wheeler, M. A., & Quintana, F. J. (2020). Astrocyte Crosstalk in CNS Inflammation. *Neuron*, 108(4), 608-622. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2020.08.012>

- Liu, H., Leak, R. K., & Hu, X. (2016). Neurotransmitter receptors on microglia. *BMJ*, 1(2), 52-58. <https://doi.org/10.1136/svn-2016-000012>
- Lively, S., & Schlichter, L. C. (2018). Microglia Responses to Pro-inflammatory Stimuli (LPS, IFN $\gamma$ +TNF $\alpha$ ) and Reprogramming by Resolving Cytokines (IL-4, IL-10). *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 12, 215. <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00215>
- Luksch, R., Castellani, M. R., Collini, P., De Bernardi, B., Conte, M., Gambini, C., Gandola, L., Garaventa, A., Biondi, D., Podda, M., Sementa, A. R., Gatta, G., & Tonini, G. P. (2016). Neuroblastoma (Peripheral neuroblastic tumours). *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 107, 163-181. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2016.10.001>
- Ma, B., Ruan, H. Z., Cockayne, D. A., Ford, A. P., Burnstock, G., & Dunn, P. M. (2004). Identification of P2X receptors in cultured mouse and rat parasympathetic otic ganglion neurones including P2X knockout studies. *Neuropharmacology*, 46(7), 1039–1048. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2004.01.009>
- Ma, B., Yu, L., Fan, J., Cong, B., He, P., Ni, X., & Burnstock, G. (2011). Estrogen modulation of peripheral pain signal transduction : Involvement of P2X3 receptors. *Purinergic Signalling*, 7(1), 73-83. <https://doi.org/10.1007/s11302-010-9212-9>
- Magalhaes, A. C., Dunn, H., & Ferguson, S. S. (2012). Regulation of GPCR activity, trafficking and localization by GPCR-interacting proteins : Regulation of G-protein-coupled receptor activity. *British Journal of Pharmacology*, 165(6), 1717-1736. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01552.x>
- Mahaut Smith, M. P., Evans, R. J., & Vial, C. (2019). Development of a P2X1-eYFP receptor knock-in mouse to track receptors in real time. *Purinergic Signalling*, 15(3), 397-402. <https://doi.org/10.1007/s11302-019-09666-1>
- Malecki, R., Fiodorenko-Dumas, Z., Jakobsche-Policht, U., Malodobra, M., & Adamiec, R. (2013). Altered monocyte calcium-sensing receptor expression in patients with type 2 diabetes mellitus and atherosclerosis. *Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society*, 64(4), 521–527.
- Mamillapalli, R., & Wysolmerski, J. (2010). The calcium-sensing receptor couples to Galpha(s) and regulates PTHrP and ACTH secretion in pituitary cells. *The Journal of endocrinology*, 204(3), 287–297. <https://doi.org/10.1677/JOE-09-0183>
- Mamillapalli, R., VanHouten, J., Zawalich, W., & Wysolmerski, J. (2008). Switching of G-protein Usage by the Calcium-sensing Receptor Reverses Its Effect on Parathyroid Hormone-related Protein Secretion in Normal Versus Malignant Breast Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 283(36), 24435-24447. <https://doi.org/10.1074/jbc.M801738200>
- Mansoor, S. E., Lü, W., Oosterheert, W., Shekhar, M., Tajkhorshid, E., & Gouaux, E. (2016). X-ray structures define human P2X(3) receptor gating cycle and antagonist action. *Nature*, 538(7623), 66–71. <https://doi.org/10.1038/nature19367>
- Marchese, A., Paing, M. M., Temple, B. R. S., & Trejo, J. (2008). G Protein–Coupled Receptor Sorting to Endosomes and Lysosomes. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 48(1), 601-629. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.48.113006.094646>
- Márquez-Roperó, M., Benito, E., Plaza-Zabala, A., & Sierra, A. (2020). Microglial Corpse Clearance : Lessons From Macrophages. *Frontiers in Immunology*, 11, 506. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00506>



- Massa, P. T., Aleyasin, H., Park, D. S., Mao, X., & Barger, S. W. (2006). NFκB in neurons? The Uncertainty Principle in neurobiology: Neuron-specific NFκB regulation. *Journal of Neurochemistry*, 97(3), 607-618. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.03810.x>
- Masuch, A., Shieh, C.-H., van Rooijen, N., van Calker, D., & Biber, K. (2016). Mechanism of microglia neuroprotection : Involvement of P2X7, TNFα, and valproic acid: Microglial Neuroprotection by P2X7 and VPA. *Glia*, 64(1), 76-89. <https://doi.org/10.1002/glia.22904>
- McCarthy, A. E., Yoshioka, C., & Mansoor, S. E. (2019). Full-Length P2X<sub>7</sub> Structures Reveal How Palmitoylation Prevents Channel Desensitization. *Cell*, 179(3), 659–670.e13. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.09.017>
- McNeil, S. E., Hobson, S. A., Nipper, V., & Rodland, K. D. (1998). Functional Calcium-sensing Receptors in Rat Fibroblasts Are Required for Activation of SRC Kinase and Mitogen-activated Protein Kinase in Response to Extracellular Calcium. *Journal of Biological Chemistry*, 273(2), 1114-1120. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.2.1114>
- Medawar, P. B. (1948). *IMUNITY TO HOMOLOGOUS GRAFTED SKIN. III. THE FATE OF SKIN HOMOGRAFTS TRANSPLANTED TO THE BRAIN, TO SUBCUTANEOUS TISSUE, AND TO THE ANTERIOR CHAMBER OF THE EYE.*
- Melani, A., Turchi, D., Vannucchi, M. G., Cipriani, S., Gianfriddo, M., & Pedata, F. (2005). ATP extracellular concentrations are increased in the rat striatum during in vivo ischemia. *Neurochemistry International*, 47(6), 442-448. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2005.05.014>
- Mori, M., Heuss, C., Gähwiler, B. H., & Gerber, U. (2001). Fast synaptic transmission mediated by P2X receptors in CA3 pyramidal cells of rat hippocampal slice cultures. *The Journal of Physiology*, 535(1), 115-123. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.2001.t01-1-00115.x>
- Muñoz, M. F., Griffith, T. N., & Contreras, J. E. (2021). Mechanisms of ATP release in pain : Role of pannexin and connexin channels. *Purinergic Signalling*, 17(4), 549-561. <https://doi.org/10.1007/s11302-021-09822-6>
- Murrell-Lagnado R. D. (2017). Regulation of P2X Purinergic Receptor Signaling by Cholesterol. *Current topics in membranes*, 80, 211–232. <https://doi.org/10.1016/bs.ctm.2017.05.004>
- Nagarajan, S., Chesla, S., Cobern, L., Anderson, P., Zhu, C., & Selvaraj, P. (1995). Ligand Binding and Phagocytosis by CD16 (Fc γ Receptor III) Isoforms. *Journal of Biological Chemistry*, 270(43), 25762-25770. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.43.25762>
- Neher, J. J., & Cunningham, C. (2019). Priming Microglia for Innate Immune Memory in the Brain. *Trends in Immunology*, 40(4), 358-374. <https://doi.org/10.1016/j.it.2019.02.001>
- Nemeth, E. (2002). The search for calcium receptor antagonists (calcilytics). *Journal of Molecular Endocrinology*, 29(1), 15-21. <https://doi.org/10.1677/jme.0.0290015>
- Nemeth, E. F., & Goodman, W. G. (2016). Calcimimetic and Calcilytic Drugs : Feats, Flops, and Futures. *Calcified Tissue International*, 98(4), 341-358. <https://doi.org/10.1007/s00223-015-0052-z>
- Nemeth, E. F., & Scarpa, A. (1987). Rapid mobilization of cellular Ca<sup>2+</sup> in bovine parathyroid cells evoked by extracellular divalent cations. Evidence for a cell surface calcium receptor. *The Journal of biological chemistry*, 262(11), 5188–5196
- Nemeth, E. F., Delmar, E. G., Heaton, W. L., Miller, M. A., Lambert, L. D., Conklin, R. L., Gowen, M., Gleason, J. G., Bhatnagar, P. K., & Fox, J. (2001). Calcilytic compounds: potent and selective Ca<sup>2+</sup> receptor antagonists that stimulate secretion of parathyroid hormone. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 299(1), 323–331.

- Nemeth, E. F., Steffey, M. E., Hammerland, L. G., Hung, B. C. P., Van Wagenen, B. C., DelMar, E. G., & Balandrin, M. F. (1998). Calcimimetics with potent and selective activity on the parathyroid calcium receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(7), 4040-4045. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.7.4040>
- Netea, M. G., Balkwill, F., Chonchol, M., Cominelli, F., Donath, M. Y., Giamarellos-Bourboulis, E. J., Golenbock, D., Gresnigt, M. S., Heneka, M. T., Hoffman, H. M., Hotchkiss, R., Joosten, L. A. B., Kastner, D. L., Korte, M., Latz, E., Libby, P., Mandrup-Poulsen, T., Mantovani, A., Mills, K. H. G., ... Dinarello, C. A. (2017). A guiding map for inflammation. *Nature Immunology*, 18(8), 826-831. <https://doi.org/10.1038/ni.3790>
- Neves, S. R., Ram, P. T., & Iyengar, R. (2002). G protein pathways. *Science (New York, N.Y.)*, 296(5573), 1636–1639. <https://doi.org/10.1126/science.1071550>
- Nicke A. (2008). Homotrimeric complexes are the dominant assembly state of native P2X7 subunits. *Biochemical and biophysical research communications*, 377(3), 803–808. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.10.042>
- Nissinen, L., & Kähäri, V.-M. (2014). Matrix metalloproteinases in inflammation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1840(8), 2571-2580. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2014.03.007>
- Noh, J. S., Pak, H. J., Shin, Y. J., Riew, T. R., Park, J. H., Moon, Y. W., & Lee, M. Y. (2015). Differential expression of the calcium-sensing receptor in the ischemic and border zones after transient focal cerebral ischemia in rats. *Journal of chemical neuroanatomy*, 66-67, 40–51. <https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2015.05.001>
- Nörenberg, W., Sobottka, H., Hempel, C., Plötz, T., Fischer, W., Schmalzing, G., & Schaefer, M. (2012). Positive allosteric modulation by ivermectin of human but not murine P2X7 receptors. *British journal of pharmacology*, 167(1), 48–66. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2012.01987.x>
- North, R. A. (2002). Molecular Physiology of P2X Receptors. *Physiological Reviews*, 82(4), 1013-1067. <https://doi.org/10.1152/physrev.00015.2002>
- Oakes, S. G., Martin, W. J., Lisek, C. A., & Powis, G. (1988). Incomplete hydrolysis of the calcium indicator precursor fura-2 pentaacetoxymethyl ester (fura-2 AM) by cells. *Analytical Biochemistry*, 169(1), 159-166. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(88\)90267-9](https://doi.org/10.1016/0003-2697(88)90267-9)
- Ohsawa, K., Irino, Y., Nakamura, Y., Akazawa, C., Inoue, K., & Kohsaka, S. (2007). Involvement of P2X<sub>4</sub> and P2Y<sub>12</sub> receptors in ATP-induced microglial chemotaxis. *Glia*, 55(6), 604-616. <https://doi.org/10.1002/glia.20489>
- Okazaki, T., Saito, D., Inden, M., Kawaguchi, K., Wakimoto, S., Nakahari, T., & Asano, S. (2020). Moesin is involved in microglial activation accompanying morphological changes and reorganization of the actin cytoskeleton. *The Journal of Physiological Sciences*, 70(1), 52. <https://doi.org/10.1186/s12576-020-00779-6>
- Olszak, I. T., Poznansky, M. C., Evans, R. H., Olson, D., Kos, C., Pollak, M. R., Brown, E. M., & Scadden, D. T. (2000). Extracellular calcium elicits a chemokinetic response from monocytes in vitro and in vivo. *The Journal of clinical investigation*, 105(9), 1299–1305. <https://doi.org/10.1172/JCI9799>
- Oury, C., Lecut, C., Hego, A., Wéra, O., & Delierneux, C. (2015). Purinergic control of inflammation and thrombosis : Role of P2X1 receptors. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 13, 106-110. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2014.11.008>
- Paccou, J., Boudot, C., Renard, C., Liabeuf, S., Kamel, S., Fardellone, P., Massy, Z., Brazier, M., & Mentaverri, R. (2014). Total calcium-sensing receptor expression in circulating monocytes is

- increased in rheumatoid arthritis patients with severe coronary artery calcification. *Arthritis research & therapy*, 16(5), 412. <https://doi.org/10.1186/s13075-014-0412-5>
- Pak, H.-J., Riew, T.-R., Shin, Y.-J., Choi, J.-H., Jin, X., & Lee, M.-Y. (2016). Enhanced expression of the calcium-sensing receptor in reactive astrocytes following ischemic injury in vivo and in vitro. *Journal of the Neurological Sciences*, 366, 102-109. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2016.05.015>
- Pan, K., & Garaschuk, O. (2022). The role of intracellular calcium-store-mediated calcium signals in in vivo sensor and effector functions of microglia. *The Journal of physiology*, 10.1113/JP279521. Advance online publication. <https://doi.org/10.1113/JP279521>
- Pankratov, Y., Lalo, U., Verkhratsky, A., & North, R. A. (2006). Vesicular release of ATP at central synapses. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, 452(5), 589-597. <https://doi.org/10.1007/s00424-006-0061-x>
- Pascual, O., Ben Achour, S., Rostaing, P., Triller, A., & Bessis, A. (2012). Microglia activation triggers astrocyte-mediated modulation of excitatory neurotransmission. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(4). <https://doi.org/10.1073/pnas.1111098109>
- Pearce, S. H., Bai, M., Quinn, S. J., Kifor, O., Brown, E. M., & Thakker, R. V. (1996). Functional characterization of calcium-sensing receptor mutations expressed in human embryonic kidney cells. *The Journal of clinical investigation*, 98(8), 1860–1866. <https://doi.org/10.1172/JCI118987>
- Pearson, G., Robinson, F., Gibson, T. B., Xu, B.-E., Karandikar, M., Berman, K., & Cobb, M. H. (2001). *Mitogen-Activated Protein (MAP) Kinase Pathways: Regulation and Physiological Functions*. 22(2).
- Perry, V. H., Cunningham, C., & Holmes, C. (2007). Systemic infections and inflammation affect chronic neurodegeneration. *Nature Reviews Immunology*, 7(2), 161-167. <https://doi.org/10.1038/nri2015>
- Peters, A., Verderosa, A., & Sethares, C. (2008). The neuroglial population in the primary visual cortex of the aging rhesus monkey: Neuroglial Cells and Aging in Cerebral Cortex. *Glia*, 56(11), 1151-1161. <https://doi.org/10.1002/glia.20686>
- Pocock, J. M., & Kettenmann, H. (2007). Neurotransmitter receptors on microglia. *Trends in Neurosciences*, 30(10), 527-535. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2007.07.007>
- Poskanzer, K. E., & Molofsky, A. V. (2018). Dynamism of an Astrocyte In Vivo : Perspectives on Identity and Function. *Annual Review of Physiology*, 80(1), 143-157. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021317-121125>
- Possel, H., Noack, H., Putzke, J., Wolf, G., & Sies, H. (2000). Selective upregulation of inducible nitric oxide synthase (iNOS) by lipopolysaccharide (LPS) and cytokines in microglia : In vitro and in vivo studies. *Glia*, 32(1), 51-59. [https://doi.org/10.1002/1098-1136\(200010\)32:1<51::AID-GLIA50>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/1098-1136(200010)32:1<51::AID-GLIA50>3.0.CO;2-4)
- Quinn, S. J., Bai, M., & Brown, E. M. (2004). PH Sensing by the Calcium-sensing Receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 279(36), 37241-37249. <https://doi.org/10.1074/jbc.M404520200>
- Quinn, S. J., Ye, C.-P., Diaz, R., Kifor, O., Bai, M., Vassilev, P., & Brown, E. (1997). The Ca<sup>2+</sup>-sensing receptor : A target for polyamines. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 273(4), C1315-C1323. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1997.273.4.C1315>
- Qureshi, O. S., Paramasivam, A., Yu, J. C. H., & Murrell-Lagnado, R. D. (2007). Regulation of P2X4 receptors by lysosomal targeting, glycan protection and exocytosis. *Journal of Cell Science*, 120(21), 3838-3849. <https://doi.org/10.1242/jcs.010348>

- Ransohoff, R. M. (2016). A polarizing question : Do M1 and M2 microglia exist? *Nature Neuroscience*, 19(8), 987-991. <https://doi.org/10.1038/nn.4338>
- Ransohoff, R. M., & Engelhardt, B. (2012). The anatomical and cellular basis of immune surveillance in the central nervous system. *Nature Reviews Immunology*, 12(9), 623-635. <https://doi.org/10.1038/nri3265>
- Raouf, R., Chabot-Doré, A.-J., Ase, A. R., Blais, D., & Séguéla, P. (2007). Differential regulation of microglial P2X4 and P2X7 ATP receptors following LPS-induced activation. *Neuropharmacology*, 53(4), 496-504. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2007.06.010>
- Ray K. (2015). Calcium-Sensing Receptor: Trafficking, Endocytosis, Recycling, and Importance of Interacting Proteins. *Progress in molecular biology and translational science*, 132, 127–150. <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2015.02.006>
- Ren, Z., Yang, K., Zhao, M., Liu, W., Zhang, X., Chi, J., Shi, Z., Zhang, X., Fu, Y., Liu, Y., & Yin, X. (2020). Calcium-Sensing Receptor on Neutrophil Promotes Myocardial Apoptosis and Fibrosis After Acute Myocardial Infarction via NLRP3 Inflammasome Activation. *The Canadian journal of cardiology*, 36(6), 893–905. <https://doi.org/10.1016/j.cjca.2019.09.026>
- Rettinger, J., Braun, K., Hochmann, H., Kassack, M., Ullmann, H., Nickel, P., Schmalzing, G., & Lambrecht, G. (2005). Profiling at recombinant homomeric and heteromeric rat P2X receptors identifies the suramin analogue NF449 as a highly potent P2X receptor antagonist. *Neuropharmacology*, 48(3), 461-468. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2004.11.003>
- Ridge, K. M., Eriksson, J. E., Pekny, M., & Goldman, R. D. (2022). Roles of vimentin in health and disease. *Genes & Development*, 36(7-8), 391-407. <https://doi.org/10.1101/gad.349358.122>
- Robinson, L. E., Shridar, M., Smith, P., & Murrell-Lagnado, R. D. (2014). Plasma membrane cholesterol as a regulator of human and rodent P2X7 receptor activation and sensitization. *The Journal of biological chemistry*, 289(46), 31983–31994. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.574699>
- Rodrigues, R. J., Tomé, A. R., & Cunha, R. A. (2015). ATP as a multi-target danger signal in the brain. *Frontiers in Neuroscience*, 9. <https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00148>
- Rodríguez-Hernández, C. J., Mateo-Lozano, S., García, M., Briansó, F., Castrejón, N., Rodríguez, E., Suñol, M., Carcaboso, M., Lavarino, C., Mora, J., & de Torres, C. (2016). *Cinacalcet inhibits neuroblastoma tumor growth and upregulates cancer-testis antigens.*
- Rotshenker, S. (2003). Microglia and Macrophage Activation and the Regulation of Complement-Receptor-3 (CR3/MAC-1)-Mediated Myelin Phagocytosis in Injury and Disease. *Journal of Molecular Neuroscience*, 21(1), 65-72. <https://doi.org/10.1385/JMN:21:1:65>
- Rustenhoven, J., Jansson, D., Smyth, L. C., & Dragunow, M. (2017). Brain Pericytes As Mediators of Neuroinflammation. *Trends in Pharmacological Sciences*, 38(3), 291-304. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2016.12.001>
- Sadok, A., & Marshall, C. J. (2014). Rho GTPases : Masters of cell migration. *Small GTPases*, 5(4), e983878. <https://doi.org/10.4161/sgtp.29710>
- Sasaki, Y., Ohsawa, K., Kanazawa, H., Kohsaka, S., & Imai, Y. (2001). Iba1 Is an Actin-Cross-Linking Protein in Macrophages/Microglia. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 286(2), 292-297. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.5388>
- Saul, A., Hausmann, R., Kless, A., & Nicke, A. (2013). Heteromeric assembly of P2X subunits. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 7. <https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00250>

- Savio, L. E. B., de Andrade Mello, P., da Silva, C. G., & Coutinho-Silva, R. (2018). The P2X7 Receptor in Inflammatory Diseases: Angel or Demon? *Frontiers in Pharmacology*, 9, 52. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00052>
- Seol, S.-H., & Chung, G. (2022). Estrogen-dependent regulation of transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) and P2X purinoceptor 3 (P2X3): Implication in burning mouth syndrome. *Journal of Dental Sciences*, 17(1), 8-13. <https://doi.org/10.1016/j.jds.2021.06.007>
- Shabab, T., Khanabdali, R., Moghadamtousi, S. Z., Kadir, H. A., & Mohan, G. (2017). Neuroinflammation pathways: a general review. *The International journal of neuroscience*, 127(7), 624–633. <https://doi.org/10.1080/00207454.2016.1212854>
- Shestopalov, V. I., & Slepak, V. Z. (2014). Molecular pathways of pannexin1-mediated neurotoxicity. *Frontiers in Physiology*, 5. <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00023>
- Shieh, C.-H., Heinrich, A., Serchov, T., van Calker, D., & Biber, K. (2014). P2X7-dependent, but differentially regulated release of IL-6, CCL2, and TNF- $\alpha$  in cultured mouse microglia: P2X7, Cytokines, and Microglia. *Glia*, 62(4), 592-607. <https://doi.org/10.1002/glia.22628>
- Sidhu, A., Sullivan, M., Kohout, T., Balen, P., & Fishman, P. H. (1991). D1 dopamine receptors can interact with both stimulatory and inhibitory guanine nucleotide binding proteins. *Journal of neurochemistry*, 57(4), 1445–1451. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1991.tb08312.x>
- Sim, J. A., Broomhead, H. E., & North, R. A. (2008). Ectodomain lysines and suramin block of P2X1 receptors. *The Journal of biological chemistry*, 283(44), 29841–29846. <https://doi.org/10.1074/jbc.M802523200>
- Sim, J. A., Park, C.-K., Oh, S. B., Evans, R. J., & North, R. A. (2007). P2X<sub>1</sub> and P2X<sub>4</sub> receptor currents in mouse macrophages: P2X receptor currents in macrophages. *British Journal of Pharmacology*, 152(8), 1283-1290. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707504>
- Smith, J. S., Lefkowitz, R. J., & Rajagopal, S. (2018). Biased signalling: From simple switches to allosteric microprocessors. *Nature Reviews Drug Discovery*, 17(4), 243-260. <https://doi.org/10.1038/nrd.2017.229>
- Sofroniew, M. V., & Vinters, H. V. (2010). Astrocytes: Biology and pathology. *Acta Neuropathologica*, 119(1), 7-35. <https://doi.org/10.1007/s00401-009-0619-8>
- Solle, M., Labasi, J., Perregaux, D. G., Stam, E., Petrushova, N., Koller, B. H., Griffiths, R. J., & Gabel, C. A. (2001). Altered Cytokine Production in Mice Lacking P2X7Receptors. *Journal of Biological Chemistry*, 276(1), 125-132. <https://doi.org/10.1074/jbc.M006781200>
- Spiegel A. M. (1987). Signal transduction by guanine nucleotide binding proteins. *Molecular and cellular endocrinology*, 49(1), 1–16. [https://doi.org/10.1016/0303-7207\(87\)90058-x](https://doi.org/10.1016/0303-7207(87)90058-x)
- Spires-Jones, T. L., & Hyman, B. T. (2014). The Intersection of Amyloid Beta and Tau at Synapses in Alzheimer's Disease. *Neuron*, 82(4), 756-771. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.05.004>
- Steddon, S. J., & Cunningham, J. (2005). Calcimimetics and calcilytics—Fooling the calcium receptor. *The Lancet*, 365(9478), 2237-2239. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)66782-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)66782-7)
- Stepanchick, A., McKenna, J., McGovern, O., Huang, Y., & Breitwieser, G. E. (2010). Calcium Sensing Receptor Mutations Implicated in Pancreatitis and Idiopathic Epilepsy Syndrome Disrupt an Arginine-rich Retention Motif. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 26(3), 363-374. <https://doi.org/10.1159/000320560>
- Stout, C. E., Costantin, J. L., Naus, C. C. G., & Charles, A. C. (2002). Intercellular Calcium Signaling in Astrocytes via ATP Release through Connexin Hemichannels. *Journal of Biological Chemistry*, 277(12), 10482-10488. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109902200>

- Stout, C., Goodenough, D. A., & Paul, D. L. (2004). Connexins : Functions without junctions. *Current Opinion in Cell Biology*, 16(5), 507-512. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2004.07.014>
- Sugama, S., & Kakinuma, Y. (2021). Noradrenaline as a key neurotransmitter in modulating microglial activation in stress response. *Neurochemistry International*, 143, 104943. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2020.104943>
- Sugama, S., Takenouchi, T., Hashimoto, M., Ohata, H., Takenaka, Y., & Kakinuma, Y. (2019). Stress-induced microglial activation occurs through  $\beta$ -adrenergic receptor : Noradrenaline as a key neurotransmitter in microglial activation. *Journal of Neuroinflammation*, 16(1), 266. <https://doi.org/10.1186/s12974-019-1632-z>
- Surprenant, A., Rassendren, F., Kawashima, E., North, R. A., & Buell, G. (1996). The Cytolytic P<sub>2Z</sub> Receptor for Extracellular ATP Identified as a P<sub>2X7</sub> Receptor (P2X<sub>7</sub>). *Science*, 272(5262), 735-738. <https://doi.org/10.1126/science.272.5262.735>
- Surprenant, A., Schneider, D. A., Wilson, H. L., Galligan, J. J., & North, R. A. (2000). Functional properties of heteromeric P2X<sub>1/5</sub> receptors expressed in HEK cells and excitatory junction potentials in guinea-pig submucosal arterioles. *Journal of the Autonomic Nervous System*, 81(1-3), 249-263. [https://doi.org/10.1016/S0165-1838\(00\)00123-5](https://doi.org/10.1016/S0165-1838(00)00123-5)
- Suurväli, J., Boudinot, P., Kanellopoulos, J., & Rützel Boudinot, S. (2017). P2X<sub>4</sub> : A fast and sensitive purinergic receptor. *Biomedical Journal*, 40(5), 245-256. <https://doi.org/10.1016/j.bj.2017.06.010>
- Suzuki, N., Hajicek, N., & Kozasa, T. (2009). Regulation and Physiological Functions of G12/13-Mediated Signaling Pathways. *Neurosignals*, 17(1), 55-70. <https://doi.org/10.1159/000186690>
- Suzumura, A. (2013). Neuron-Microglia Interaction in Neuroinflammation. *Current Protein & Peptide Science*, 14(1), 16-20. <https://doi.org/10.2174/1389203711314010004>
- Swanborg, R. H. (2001). Experimental autoimmune encephalomyelitis in the rat : Lessons in T-cell immunology and autoreactivity: EAE in the rat. *Immunological Reviews*, 184(1), 129-135. <https://doi.org/10.1034/j.1600-065x.2001.1840112.x>
- Szepesi, Z., Manouchehrian, O., Bachiller, S., & Deierborg, T. (2018). Bidirectional Microglia–Neuron Communication in Health and Disease. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 12, 323. <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00323>
- Tanaka, J., & Maeda, N. (1996). Microglial Ramification Requires Nondiffusible Factors Derived from Astrocytes. *Experimental Neurology*, 137(2), 367-375. <https://doi.org/10.1006/exnr.1996.0038>
- Tanga, F. Y., Raghavendra, V., & DeLeo, J. A. (2004). Quantitative real-time RT-PCR assessment of spinal microglial and astrocytic activation markers in a rat model of neuropathic pain. *Neurochemistry International*, 45(2-3), 397-407. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2003.06.002>
- Tavares, L. P., Negreiros-Lima, G. L., Lima, K. M., E Silva, P. M. R., Pinho, V., Teixeira, M. M., & Sousa, L. P. (2020). Blame the signaling: Role of cAMP for the resolution of inflammation. *Pharmacological research*, 159, 105030. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.105030>
- Terrando, N., Fidalgo, A. R., Vizcaychipi, M., Cibelli, M., Ma, D., Monaco, C., Feldmann, M., & Maze, M. (2010). *TREhsearchimpact of IL-1 modulation on the development of lipopolysaccharide-induced cognitive dysfunction.*
- Thomsen, A. R. B., Hvidtfeldt, M., & Bräuner-Osborne, H. (2012). Biased agonism of the calcium-sensing receptor. *Cell Calcium*, 51(2), 107-116. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2011.11.009>
- Thorn, J. A., & Jarvis, S. M. (1996). Adenosine transporters. *General Pharmacology: The Vascular System*, 27(4), 613-620. [https://doi.org/10.1016/0306-3623\(95\)02053-5](https://doi.org/10.1016/0306-3623(95)02053-5)

- Tian, X., Kang, D. S., & Benovic, J. L. (2014).  $\beta$ -Arrestins and G Protein-Coupled Receptor Trafficking. In V. V. Gurevich (Éd.), *Arrestins—Pharmacology and Therapeutic Potential* (Vol. 219, p. 173-186). Springer Berlin Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-41199-1\\_9](https://doi.org/10.1007/978-3-642-41199-1_9)
- Torres, G. E., Egan, T. M., & Voigt, M. M. (1999). Identification of a domain involved in ATP-gated ionotropic receptor subunit assembly. *The Journal of biological chemistry*, 274(32), 22359–22365. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.32.22359>
- Torres, G. E., Haines, W. R., Egan, T. M., & Voigt, M. M. (1998). Co-Expression of P2X<sub>1</sub> and P2X<sub>5</sub> Receptor Subunits Reveals a Novel ATP-Gated Ion Channel. *Molecular Pharmacology*, 54(6), 989-993. <https://doi.org/10.1124/mol.54.6.989>
- Toulmé, E., Soto, F., Garret, M., & Boué-Grabot, E. (2006). Functional Properties of Internalization-Deficient P2X<sub>4</sub> Receptors Reveal a Novel Mechanism of Ligand-Gated Channel Facilitation by Ivermectin. *Molecular Pharmacology*, 69(2), 576-587. <https://doi.org/10.1124/mol.105.018812>
- Trang, M., Schmalzing, G., Müller, C. E., & Markwardt, F. (2020). Dissection of P2X<sub>4</sub> and P2X<sub>7</sub> Receptor Current Components in BV-2 Microglia. *International journal of molecular sciences*, 21(22), 8489. <https://doi.org/10.3390/ijms21228489>
- Tsuda, M., Shigemoto-Mogami, Y., Koizumi, S., Mizokoshi, A., Kohsaka, S., Salter, M. W., & Inoue, K. (2003). P2X<sub>4</sub> receptors induced in spinal microglia gate tactile allodynia after nerve injury. *Nature*, 424(6950), 778–783. <https://doi.org/10.1038/nature01786>
- Tucker, A. L., Jia, L. G., Holeton, D., Taylor, A. J., & Linden, J. (2000). Dominance of G(s) in doubly G(s)/G(i)-coupled chimaeric A(1)/A(2A) adenosine receptors in HEK-293 cells. *The Biochemical journal*, 352 Pt 1(Pt 1), 203–210.
- Ulmann, L., Levavasseur, F., Avignone, E., Peyroutou, R., Hirbec, H., Audinat, E., & Rassendren, F. (2013). Involvement of P2X<sub>4</sub> receptors in hippocampal microglial activation after *status epilepticus*: Microglial P2X<sub>4</sub>R in the Epileptic Hippocampus. *Glia*, 61(8), 1306-1319. <https://doi.org/10.1002/glia.22516>
- Valera, S., Hussy, N., Evans, R. J., Adami, N., North, R. A., Surprenant, A., & Buell, G. (1994). A new class of ligand-gated ion channel defined by P2X receptor for extracellular ATP. *Nature*, 371(6497), 516-519. <https://doi.org/10.1038/371516a0>
- VanRyzin, J. W. (2021). Phagocytic microglia in development : Are they what they eat? *Brain, Behavior, & Immunity - Health*, 18, 100373. <https://doi.org/10.1016/j.bbih.2021.100373>
- Verkhatsky, A., Ho, M. S., Zorec, R., & Parpura, V. (2019). The Concept of Neuroglia. In A. Verkhatsky, M. S. Ho, R. Zorec, & V. Parpura (Éds.), *Neuroglia in Neurodegenerative Diseases* (Vol. 1175, p. 1-13). Springer Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-13-9913-8\\_1](https://doi.org/10.1007/978-981-13-9913-8_1)
- Verkhatsky, A., Zorec, R., & Parpura, V. (2017). Stratification of astrocytes in healthy and diseased brain : Astroglia in health and disease. *Brain Pathology*, 27(5), 629-644. <https://doi.org/10.1111/bpa.12537>
- von Bartheld, C. S., Bahney, J., & Herculano-Houzel, S. (2016). The search for true numbers of neurons and glial cells in the human brain : A review of 150 years of cell counting: Quantifying neurons and glia in human brain. *Journal of Comparative Neurology*, 524(18), 3865-3895. <https://doi.org/10.1002/cne.24040>
- von Kügelgen, I., & Harden, T. K. (2011). Molecular pharmacology, physiology, and structure of the P2Y receptors. *Advances in pharmacology (San Diego, Calif.)*, 61, 373–415. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385526-8.00012-6>

- von Kügelgen, I., & Hoffmann, K. (2016). Pharmacology and structure of P2Y receptors. *Neuropharmacology*, *104*, 50-61. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2015.10.030>
- Wang, C., Jia, Q., Sun, C., & Jing, C. (2020). Calcium sensing receptor contribute to early brain injury through the CaMKII/NLRP3 pathway after subarachnoid hemorrhage in mice. *Biochemical and biophysical research communications*, *530*(4), 651–657. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.07.081>
- Wang, J., Wang, Y., Cui, W.-W., Huang, Y., Yang, Y., Liu, Y., Zhao, W.-S., Cheng, X.-Y., Sun, W.-S., Cao, P., Zhu, M. X., Wang, R., Hattori, M., & Yu, Y. (2018). Druggable negative allosteric site of P2X3 receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *115*(19), 4939-4944. <https://doi.org/10.1073/pnas.1800907115>
- Wang, P., Wang, L., Wang, S., Li, S., Li, Y., & Zhang, L. (2015). Effects of calcium-sensing receptors on apoptosis in rat hippocampus during hypoxia/re-oxygenation through the ERK1/2 pathway. *International journal of clinical and experimental medicine*, *8*(8), 12858–12865.
- Ward, D. T., & Riccardi, D. (2012). New concepts in calcium-sensing receptor pharmacology and signalling : CaR signalling and allosteric modulators. *British Journal of Pharmacology*, *165*(1), 35-48. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01511.x>
- Ward, D. T., McLarnon, S. J., & Riccardi, D. (2002). Aminoglycosides Increase Intracellular Calcium Levels and ERK Activity in Proximal Tubular OK Cells Expressing the Extracellular Calcium-Sensing Receptor. *Journal of the American Society of Nephrology*, *13*(6), 1481-1489. <https://doi.org/10.1097/01.ASN.0000015623.73739.B8>
- Welzel, T., & Kuemmerle-Deschner, J. B. (2021). Diagnosis and Management of the Cryopyrin-Associated Periodic Syndromes (CAPS) : What Do We Know Today? *Journal of Clinical Medicine*, *10*(1), 128. <https://doi.org/10.3390/jcm10010128>
- Wildman, S. S., Brown, S. G., Rahman, M., Noel, C. A., Churchill, L., Burnstock, G., Unwin, R. J., & King, B. F. (2002). Sensitization by extracellular Ca(2+) of rat P2X(5) receptor and its pharmacological properties compared with rat P2X(1). *Molecular pharmacology*, *62*(4), 957–966. <https://doi.org/10.1124/mol.62.4.957>
- Woll, K. A., & Van Petegem, F. (2022). Calcium-release channels : Structure and function of IP<sub>3</sub> receptors and ryanodine receptors. *Physiological Reviews*, *102*(1), 209-268. <https://doi.org/10.1152/physrev.00033.2020>
- Xiang, Z., & Burnstock, G. (2005). Expression of P2X receptors on rat microglial cells during early development. *Glia*, *52*(2), 119–126. <https://doi.org/10.1002/glia.20227>
- Xing, S., Grol, M. W., Grutter, P. H., Dixon, S. J., & Komarova, S. V. (2016). Modeling Interactions among Individual P2 Receptors to Explain Complex Response Patterns over a Wide Range of ATP Concentrations. *Frontiers in physiology*, *7*, 294. <https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00294>
- Yan, Z., Khadra, A., Sherman, A., & Stojilkovic, S. S. (2011). Calcium-dependent block of P2X7 receptor channel function is allosteric. *Journal of General Physiology*, *138*(4), 437-452. <https://doi.org/10.1085/jgp.201110647>
- Ye, X., Zhu, M., Che, X., Wang, H., Liang, X.-J., Wu, C., Xue, X., & Yang, J. (2020). Lipopolysaccharide induces neuroinflammation in microglia by activating the MTOR pathway and downregulating Vps34 to inhibit autophagosome formation. *Journal of Neuroinflammation*, *17*(1), 18. <https://doi.org/10.1186/s12974-019-1644-8>
- Zabala, A., Vazquez-Villoldo, N., Rissiek, B., Gejo, J., Martin, A., Palomino, A., Perez-Samartín, A., Pulagam, K. R., Lukowiak, M., Capetillo-Zarate, E., Llop, J., Magnus, T., Koch-Nolte, F., Rassendren,



- F., Matute, C., & Domercq, M. (2018). P2X4 receptor controls microglia activation and favors remyelination in autoimmune encephalitis. *EMBO Molecular Medicine*, 10(8). <https://doi.org/10.15252/emmm.201708743>
- Zeis, T., Enz, L., & Schaeren-Wiemers, N. (2016). The immunomodulatory oligodendrocyte. *Brain Research*, 1641, 139-148. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2015.09.021>
- Zhai, T. Y., Cui, B. H., Zou, L., Zeng, J. Y., Gao, S., Zhao, Q., Wang, Y., Xie, W. L., & Sun, Y. H. (2017). Expression and Role of the Calcium-Sensing Receptor in Rat Peripheral Blood Polymorphonuclear Neutrophils. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2017, 3869561. <https://doi.org/10.1155/2017/3869561>
- Zhang, C., Zhang, T., Zou, J., Miller, C. L., Gorkhali, R., Yang, J.-Y., Schillmiller, A., Wang, S., Huang, K., Brown, E. M., Moremen, K. W., Hu, J., & Yang, J. J. (2016). Structural basis for regulation of human calcium-sensing receptor by magnesium ions and an unexpected tryptophan derivative co-agonist. *Science Advances*, 2(5), e1600241. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1600241>
- Zhang, L., Ji, T., Wang, Q., Meng, K., Zhang, R., Yang, H., Liao, C., Ma, L., & Jiao, J. (2017). Calcium-Sensing Receptor Stimulation in Cultured Glomerular Podocytes Induces TRPC6-Dependent Calcium Entry and RhoA Activation. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 43(5), 1777-1789. <https://doi.org/10.1159/000484064>
- Zhong, Y., Dunn, P. M., & Burnstock, G. (2000). Guinea-pig sympathetic neurons express varying proportions of two distinct P2X receptors. *The Journal of physiology*, 523 Pt 2(Pt 2), 391-402. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.2000.t01-1-00391.x>
- Zhong, Y., Dunn, P. M., Bardini, M., Ford, A. P., Cockayne, D. A., & Burnstock, G. (2001). Changes in P2X receptor responses of sensory neurons from P2X3-deficient mice. *The European journal of neuroscience*, 14(11), 1784-1792. <https://doi.org/10.1046/j.0953-816x.2001.01805.x>
- Zhou, B., Zuo, Y., & Jiang, R. (2019). Astrocyte morphology : Diversity, plasticity, and role in neurological diseases. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, 25(6), 665-673. <https://doi.org/10.1111/cns.13123>
- Zhuang, X., Northup, J. K., & Ray, K. (2012). Large Putative PEST-like Sequence Motif at the Carboxyl Tail of Human Calcium Receptor Directs Lysosomal Degradation and Regulates Cell Surface Receptor Level. *Journal of Biological Chemistry*, 287(6), 4165-4176. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.271528>
- Zimmermann, H. (2000). Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 362(4-5), 299-309. <https://doi.org/10.1007/s002100000309>

## X. Annexe

### Annexe 1

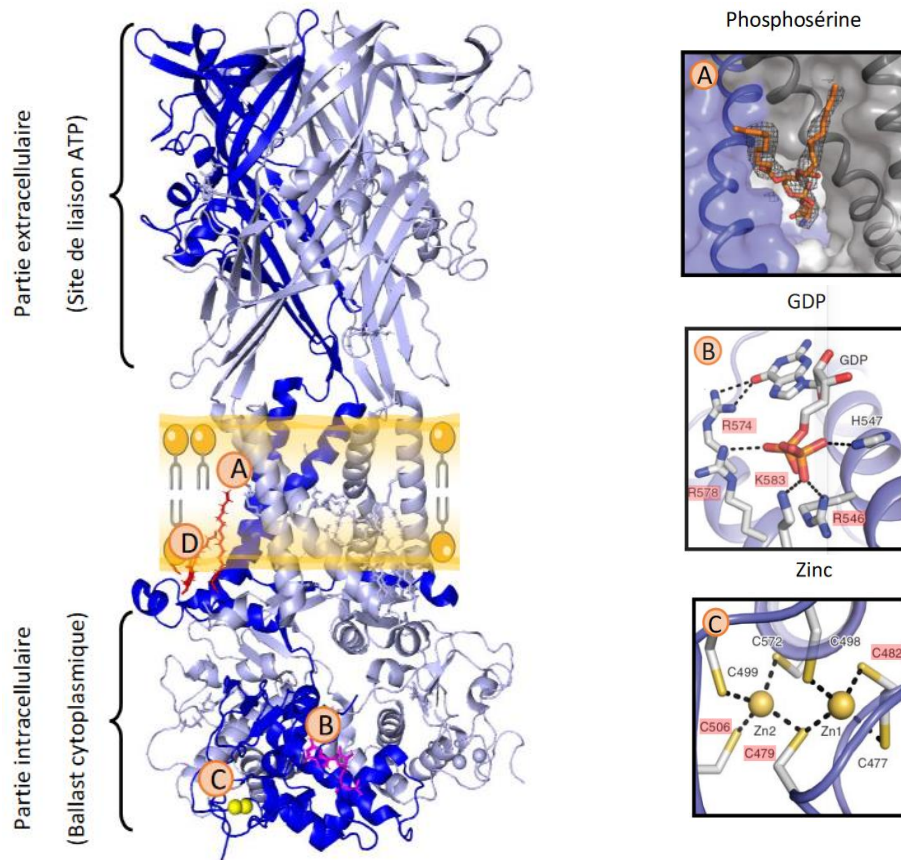
#### **Etude du complexe P2X7 – Anoctamine 6 et son implication dans les douleurs neuropathiques - Mutations réalisées sur le récepteur P2X7**

En octobre 2019, la structure complète du récepteur P2X7 du rat a été publiée ([McCarthy, Yoshioka et Mansoor, 2019](#)) et a permis de valider deux hypothèses par rapport à ce récepteur. Tout d'abord la présence d'une région permettant de véritablement l'ancrer dans la membrane plasmique et ainsi empêcher sa désensibilisation, ainsi que l'existence d'une grande partie C-terminale intracellulaire, le ballast cytoplasmique, décrite chez aucun autre récepteur purinergique à ce jour. Ce ballast possède plusieurs régions/séquences d'acides aminés dont la fonction reste méconnue. Ainsi on trouve deux sites de liaison pour le zinc et un site de liaison par sous-unité pour le GDP. De plus, le ballast peut servir de véritable port d'attache pour former des complexes multiprotéiques permettant entre autres la perméabilisation cellulaire et l'initiation de cascades moléculaires pro nociceptives.

Un des objectifs de cette thèse était d'étudier le complexe récepteur P2X7/canal Ano6. A cet effet, nous avons réalisé plusieurs mutations dirigées dans des régions clés de ce récepteur en nous inspirant de la structure Cryo-EM publiée par McCarthy en 2019. Nous avons également généré un récepteur P2X7 tronqué après le résidu 395 (P2X7-Delta Ballast).

De plus, nous avons développé plusieurs récepteurs P2X7 « photoswitchable » permettant de limiter / de réguler les potentielles interactions intracellulaires des sous-unités en insérant la protéine LOV-2 dont la conformation change sous l'action de la lumière bleue.

Ces mutations, devraient permettre à terme d'étudier et de mieux comprendre l'implication de ces régions intracellulaires dans la signalisation P2X7. Néanmoins cette partie de la thèse n'est pas totalement achevée car les caractérisations fonctionnelles de ces différents mutants doivent encore être réalisées.



**Figure 72** : Structure et particularité du récepteur P2X7. Cette structure, représentée ici à l'aide du logiciel PyMol®, présente une partie extracellulaire avec trois sites de liaison à l'ATP ainsi qu'une partie intracellulaire, appelée ballast cytoplasmique. Cette protéine possède plusieurs structures jamais décrites chez aucun autre récepteur purinergique. Au niveau de son domaine transmembranaire on retrouve un site de liaison aux phospholipides (A) Des expériences de modélisation suggèrent que la tête polaire des phosphosérines vient s'insérer entre les hélices du segment transmembranaire du récepteur P2X7. Ce mécanisme peut intervenir dans l'activité scramblase de l'anoctamine 6, lorsqu'elle est associée au récepteur P2X7, mais aussi dans le phénomène de perméabilisation cellulaire. Le ballast cytoplasmique de chaque sous-unité possède un site de liaison pour le GDP (B) ainsi que deux sites de liaison pour le zinc (C). Ces sites sont potentiellement impliqués dans l'adressage membranaire du récepteur. Ce dernier est véritablement ancré à la membrane plasmique par des cystéines palmitoylées (D) empêchant ainsi sa désensibilisation. Une mutation de ces cystéines fait que le récepteur désensibilise (McCarthy, Yoshioka et Mansoor, 2019).

L'ensemble des mutations réalisées sur le P2X7 de rat sont résumées dans le tableau ci-dessous. Les changements d'acides aminés devraient empêcher les différents substrats (GDP, phosphosérine, Zinc), d'interagir avec leurs sites de liaisons. La délétion du ballast pour investiguer les voies intracellulaires sollicitées par cette partie du récepteur. L'ajout de la protéine LOV-2, qui change de conformation sous l'action de la lumière bleue, à divers endroits du récepteur P2X7 de rat, permettrait de moduler spécifiquement le ballast (déstructurer le ballaste pour limiter les interactions protéiques potentielles) sans impacter la fonction canal du récepteur.

Site ciblé	Mutation réalisée	
GDP	Lysine 583	Alanine
	Arginine 578	Alanine
	Arginine 574	Alanine
Phosphosérine	Valine 349	Tryptophane
	Leucine 341	Tryptophane
Zinc	Cystéine 482	Série + Alanine
	Cystéine 506	Série + Alanine
	Cystéine 479	Série + Alanine
Ballast Cytoplasmique	Délétion du ballast intra cellulaire après le résidu 395	
P2X7 + LOV2	LOV2 en N-terminal	
	LOV2 après le résidu K372	
	LOV2 après le ballast cytoplasmique (après P396)	
	LOV2 après le résidu G538	

*Tableau 24 : Mutations réalisées sur le récepteur P2X7 de rat.*

## Communications orales et par affiches

### Communications affiches:

Manipulation of microglial phenotype in culture, WOLF Patrick, FITTERER Chantal, GRUTTER Thomas, SCHLICHTER Rémy ; ED days 2021 (21-22 Avril 2021, en ligne)

Manipulation of microglial phenotype in culture, WOLF Patrick, FITTERER Chantal, HUGEL Sylvain, GRUTTER Thomas, SCHLICHTER Rémy ; NeuroFrance2021 (19-21 mai 2021, en ligne)

Microglia polarization and its modulation by environmental factors, WOLF Patrick, FITTERER Chantal, GRUTTER Thomas, SCHLICHTER Rémy ; FENS2022 (9-13 juillet 2022, Paris, France)

### Communications orales:

Purinergic signalling in microglia cells, WOLF Patrick, GRUTTER Thomas, SCHLICHTER Rémy ; EURIDOL Day (1 Octobre 2021, College doctoral, Strasbourg, France)

P2X7 et douleur neuropathique, WOLF Patrick, DoctoRencontre (26 Mai 2021, INCI, Strasbourg, France) Présentation grand publique

### Publication:

Kate Dunning, Adeline Martz, Francisco Andrés Peralta, Federico Cevoli, Eric Boué-Grabot, Thierry Chataigneau, Patrick Wolf, Vincent Compan, Fanny Gautherat, Thomas Grutter (2021) P2X7 receptors and TMEM16 channels are functionally coupled with implications for macropore formation and current facilitation. Int J Mol Sci, 22, 6542



**Patrick WOLF**

## Implication des récepteurs P2X de l'ATP et du calcium dans la polarisation microgliale

### Résumé

En réponse à un changement de la composition du milieu extracellulaire, les cellules microgliales vont « s'activer » pour assurer diverses fonctions et sécréter des facteurs immuno- modulateurs. Ces cellules, vont détecter la présence de pathogènes ou des variations de concentrations d'ions ou de messagers extracellulaires tels que l'adénosine triphosphate (ATP).

Nos travaux se sont intéressés au profil d'expression fonctionnelle des récepteurs-canaux (P2X) de l'ATP dans les cellules microgliales BV-2 et à l'implication du « Calcium Sensing Receptor » (CaSR) dans l'activation microgliale.

Nos résultats indiquent que les cellules BV-2 expriment, les récepteurs-canaux P2X1, P2X3, P2X4 P2X5, P2X7 et P2X1/5 fonctionnels. Nous montrons également la présence et la fonctionnalité du CaSR, un récepteur couplé aux protéines G, sur les cellules BV-2. Lorsqu'il est activé, le CaSR favorise le phénotype M2.

Ces données permettent de porter un regard nouveau sur les mécanismes d'activation et de polarisation des cellules microgliales et révèle pour la première fois l'existence d'un récepteur endogène couplé aux protéines G, le CaSR, dans l'induction de l'état M2.

**Récepteurs P2X, Récepteur sensible au Calcium (CaSR), Inflammation, Polarisation microgliale**

### Résumé en anglais

In response to changes in the composition of the extracellular environment, the microglial cells will "activate" to carry out various functions and secrete immunomodulatory factors. These cells will detect the presence of pathogens or variations in the concentrations of ions or extracellular messengers such as adenosine triphosphate (ATP).

Our work focused on the functional expression profile of ATP channel receptors (P2X) in BV-2 microglial cells and the involvement of the "Calcium Sensing Receptor" (CaSR) in microglial activation.

Our results indicate that BV-2 cells express functional P2X1, P2X3, P2X4, P2X5, P2X7 and P2X1/5 receptor-channels. We also show the presence and functionality of the CaSR, a G protein-coupled receptor, on BV-2 cells. When activated, CaSR promotes the M2 phenotype.

These data allow us to take a new look at the mechanisms of activation and polarization of microglial cells and reveal for the first time the existence of an endogenous receptor coupled to G proteins, the CaSR, in the induction of the anti-inflammatory M2 state.

**P2X receptors, Calcium sensing receptor (CaSR), Inflammation, Microgliale polarization**